



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE RepB Y SU IMPLICACIÓN EN EL PROCESO REPLICATIVO DEL PLÁSMIDO PROMISCOUO pMV158

Memoria para optar al grado de doctor

Presentada por

Lorena Bordanaba Ruiseco

Bajo la dirección de los doctores

Gloria del Solar Dongil

José Ángel Ruiz Masó

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

Madrid, 2017

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Lorena Bordanaba Ruiseco bajo la dirección de la Dra. Gloria del Solar Dongil y el Dr. José Ángel Ruiz Masó, en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con financiación concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Beca/Contrato FPI asociada al Proyecto BFU2010-19597).

Opta al grado de Doctor

VºBº Directores de Tesis

Lorena Bordanaba Ruiseco

Gloria del Solar Dongil

José Ángel Ruiz Masó

*"Tu casa no es sólo un montón de piedras,
la torre que el tiempo derrumbará;
es más que un techo, es un puente de sangre
entre los que vivieron y los que vivirán;
navata que en el río de los siglos,
con sus troncos unidos, lejos navegará."*

La Ronda de Boltaña

A mi familia

Este trabajo ha sido posible gracias a la participación y apoyo de muchos, a todos ellos mi más profundo agradecimiento.

A mis directores de tesis, que me dieron la oportunidad de vivir esta experiencia. Jose, gracias por todo lo que me has enseñado y por tener siempre tiempo para mí. Gloria, gracias por tus buenas ideas y por tu entusiasmo. Creo que el rigor científico que caracteriza vuestro trabajo es el mejor marco para una tesis doctoral.

Al resto de nuestro pequeño gran equipo, del que guardaré un recuerdo muy especial. Marta, gracias por tu gran ayuda. Gracias también a Celes, Tania y a todos los que han pasado por el labo durante este tiempo.

A Virtu, Inma, Ana, Montse, Sofi, Cris y Concha, por los buenos momentos y risas, por haber sido un gran apoyo y por alegrarme tantos días. A Ramón, porque podría pasar horas escuchándole. A Manolo, Alicia y Paloma, por todo lo que he aprendido de ellos. A Adrián, Nuria, Dami, Laura, Vero, Lorena y Wai Ting, un placer haber compartido estos años con vosotros.

Durante la realización de este trabajo he podido participar en varias colaboraciones muy enriquecedoras tanto a nivel científico como personal. Gracias al Prof. Igor Konieczny por acogerme en su laboratorio y a la Dra. Katarzyna Bury por su ayuda con los ensayos de SPR. Gracias al Prof. Miquel Coll, la Dra. Cristina Machón, el Dr. D. Roeland Boery y la Dra. Juliana Amodio por su esfuerzo y su aportación decisiva a este trabajo en lo referente a la caracterización estructural de RepB y su complejo con el DNA. Gracias a la Dra. Margarita Menéndez por su dedicación y su aportación al estudio del papel del catión metálico situado en el centro activo de RepB.

Gracias a todos aquellos que, aunque ajenos a los entresijos de esta tesis, han sido fundamentales para que no perdiera el norte. A Eva, Intza, Ire, Lau y Tere, por su amistad de la buena, porque por muy lejos que estemos nada cambia; a Perchas, Camino, Ángel, Machi y al resto de amigos de la resi, por hacerme pasar tan buenos momentos durante la carrera y continuar haciéndolo. A María, por ser mi compañera de fatigas y consejera, por su amistad incondicional. A las chicas de la peña Nexus, por estar siempre ahí.

Gracias a mi familia, mi mayor orgullo. A mi hermano, por su capacidad innata de hacerme feliz. A mi madre, por ser mi mayor apoyo. A mi padre, por ser mi mayor referente. Los tres son responsables de todo lo bueno que pueda haber en mí. A mi abuela, por estar ahí en momentos difíciles. A Rosa y Manolo, por cuidarme tantísimo. Sobre todo, gracias a Manolo, por su amor, su paciencia, por saber hacerme desconectar y tener perspectiva, por darme fuerzas para seguir adelante y por ser el mejor compañero que se puede tener.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	11
1. PLÁSMIDOS BACTERIANOS	13
1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN SEGÚN MECANISMO DE REPLICACIÓN.....	13
1.2. AMPLITUD DE RANGO DE HUESPED.....	15
1.3. CONTROL DE LA REPLICACIÓN.....	16
2. REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR EL MECANISMO RC.....	17
2.1. EL ORIGEN DE REPLICACIÓN DE DOBLE CADENA (<i>dso</i>) DE PLÁSMIDOS RCR	18
2.2. LAS PROTEÍNAS Rep INICIADORAS DE LA REPLICACIÓN POR EL MECANISMO RC.....	18
2.3. CONTROL DE LA REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS RCR.....	21
2.4. LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE CADENA SENCILLA (<i>ssso</i>) DE PLÁSMIDOS RCR	23
2.5. PROTEÍNAS DEL HUÉSPED INVOLUCRADAS EN RCR.....	23
2.6. EL MECANISMO DE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR RC Y LA IMPLICACIÓN DE Rep	24
3. LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pMV158.....	25
3.1. EL <i>dso</i> DE pMV158	27
3.2. RepB, LA PROTEÍNA INICIADORA DE LA REPLICACIÓN DE pMV158	28
4. LA HELICASA PcrA Y LA RCR	33
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	40
MATERIALES	42
1. MATERIAL BIOLÓGICO: ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS.....	42
1.1. ESTIRPES BACTERIANAS.....	42
1.2. PLÁSMIDOS.....	42
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	45
2.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i>	45
2.2. MEDIO DE CULTIVO PARA <i>S. pneumoniae</i>	45
3. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	46

4. ENZIMAS.....	46
5. PRODUCTOS QUÍMICOS, SOPORTES Y REACTIVOS	46
6. TAMPONES.....	53
MÉTODOS	56
1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	56
2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	56
3. PREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	56
4. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	57
5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE dsDNA Y OLIGOS MONOCATENARIOS.....	58
6. CUANTIFICACIÓN DE OLIGOS	58
7. SECUENCIACIÓN	59
8. LIGACIÓN DE DNA.....	59
9. ELECTROFORESIS DE DNA.....	59
9.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	59
9.2. ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE PAA	60
9.3. GELES DE SECUENCIACIÓN	60
10. FOSFORILACIÓN EN 5' DE UN OLIGO.....	60
11. MARCAJE RADIACTIVO DE OLIGOS EN 5'.....	61
12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL DOMINIO OBD DE RepB	61
13. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	61
14. SOBREPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OBD-His ₆	62
15. ELIMINACIÓN DE LA ETIQUETA His ₆ N-TERMINAL DE OBD-His ₆	63
16. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	64
17. ENSAYO DE CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) ..	65
18. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MOLÉCULAS DE OBD Y RepB ₆ ACTIVAS	66
19. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE OBD Y SUS FORMAS MUTANTES AL DNA DEL LOCUS <i>bind</i> MEDIANTE EMSA.....	66
20. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS OBD-DDR.....	67
21. ANÁLISIS DE LA COOPERATIVIDAD EN LA UNIÓN DE RepB A DNA	68
22. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE RepB, OBD Y SUS FORMAS MUTANTES SOBRE OLIGOS NO FLUORESCENTES.....	70
23. DETECCIÓN DE LOS ADUCTOS COVALENTES OBD-DNA Y RepB ₆ -DNA ..	71
24. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE RepB, OBD Y SUS FORMAS MUTANTES SOBRE OLIGOS FLUORESCENTES. DIGESTIÓN DEL ADUCTO COVALENTE CON PROTEINASA K.	73

25. SOBREPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RepB.....	74
26. SOBREPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PcrASpn.....	75
27. ENSAYOS DE ACTIVIDAD HELICASA DE PcrASpn.....	76
28. ENSAYOS DE FOOTPRINTING.....	77
28.1. ENSAYOS DE FOOTPRINTING SOBRE DNA LINEAL.....	78
29. ANÁLISIS DE AFINIDAD DE LOS COMPLEJOS PROTEÍNA-DNA MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE	79
30. DELECCIONES E INSERCCIONES ENTRE PDRs Y DDRs DE pMV158, Y ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS RESULTANTES EN <i>S. pneumoniae</i>	82
31. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PROTEÍNAS	83
RESULTADOS.....	86
ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE OBD/RepB₆ Y dso.....	88
1. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE UNIÓN DE OBD/RepB ₆ A LAS REPETICIONES DIRECTAS DEL dso.....	90
2. INFLUENCIA DE LA ETIQUETA DE His EN LA UNIÓN DE OBD A DNA	97
3. ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE LOS CONTACTOS ENTRE OBD Y EL DNA DEL dso	99
4. DETERMINACIÓN DE LOS ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE RepB ₆ IMPLICADOS EN UNIÓN A DNA.....	101
5. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE OBD/RepB ₆ Y LA ESTRUCTURA CRUCIFORME IR-I DEL dso	108
6. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS OBD-DDRC.....	112
7. ENSAYOS DE ESTEQUIOMETRÍA PARA LOS COMPLEJOS OBD-DDR Y OBD-2PDR.....	113
8. COOPERATIVIDAD EN LA UNIÓN DE OBD A LAS DDRs.....	114
9. INFLUENCIA DE LA DISTANCIA y LA CONSERVACIÓN DE FASE ENTRE PDRs Y DDRs EN LA REPLICACIÓN DE pMV158 EN <i>S. pneumoniae</i>	117
CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE OBD/RepB₆	120
1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE OBD, CONSISTENTE EN LAS ACTIVIDADES ENDONUCLEOLÍTICA Y DE TRANSFERENCIA DE CADENA.....	122
2. DETECCIÓN DE LOS ADUCTOS COVALENTES OBD-DNA Y RepB-DNA	124
3. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DEL ADUCTO COVALENTE OBD-DNA.....	130
4. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE OBD Y FORMAS MUTANTES CON MODIFICACIONES EN EL CENTRO ACTIVO: BÚSQUEDA DEL SEGUNDO RESIDUO CATALÍTICO	133

5. EL CATIÓN METÁLICO DEL CENTRO ACTIVO DE RepB Y SU EFECTO EN LA ESTABILIDAD ESTRUCTURAL Y EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA.....	145
ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE RepB₆ Y LA HELICASA PcrA DE NEUMOCOCO.....	156
1. ENSAYOS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA.....	159
2. ENSAYOS DE SPR	161
DISCUSIÓN.....	166
1. LAS INTERACCIONES DE RepB CON DISTINTOS ELEMENTOS DEL <i>dso</i> DE pMV158 TIENEN GRAN RELEVANCIA EN EL PROCESO REPLICATIVO	168
1.1. SITIOS DE UNIÓN PARA RepB EN EL <i>dso</i>	168
1.2. LAS REPETICIONES DIRECTAS DEL <i>dso</i> PODRÍAN DIRIGIR LA OLIGOMERIZACIÓN DE RepB Y LA SITUARÍAN EN EL LOCUS DONDE SE PRODUCE EL CORTE DEL DNA	170
1.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS INTERACCIONES ENTRE RepB Y DDR.....	175
2. ACTIVIDAD ENDONUCLEOLÍTICA, FORMACIÓN DE ADUCTO COVALENTE Y ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA DE CADENA SON LAS CARACTERÍSTICAS ENZIMÁTICAS DE RepB QUE POSIBILITAN LA REPLICACIÓN DE pMV158.....	175
2.1. RepB POSEE APARENTEMENTE DOS RESIDUOS CATALÍTICOS, Y99 Y H102, Y AMBOS SON CAPACES DE FORMAR ADUCTO COVALENTE.....	176
2.2. EL CATIÓN Mn ²⁺ FORMA PARTE DEL CENTRO ACTIVO, ESTABILIZA LA ESTRUCTURA DE OBD Y RepB ₆ Y PODRÍA TENER VARIOS PAPELES EN LA REPLICACIÓN DE pMV158.....	178
3. LA CONFORMACIÓN MONOMÉRICA DE RepB PODRÍA INICIAR LA REPLICACIÓN, MIENTRAS QUE LA HEXAMÉRICA PARECE ESTAR INVOLUCRADA EN EL DESPLAZAMIENTO DE LA CADENA LÍDER Y QUIZÁS CONSTITUYA LA ESPECIE INACTIVA UNA VEZ FINALIZADA LA REPLICACIÓN	180
3.1. LA CONFORMACIÓN HEXAMÉRICA DE RepB PODRÍA SER RELEVANTE EN LA ACTIVIDAD HELICASA DURANTE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA	181
3.2. EL INICIO DE LA REPLICACIÓN PODRÍA REQUERIR LA FORMA MONOMÉRICA DE RepB, MIENTRAS QUE EN LA TERMINACIÓN RepB SE LIBERARÍA COMO HEXÁMERO, CONFORMACIÓN INCAPAZ DE INICIAR UNA NUEVA RONDA DE REPLICACIÓN.....	183
4. MODELO PARA LA REPLICACIÓN DE pMV158	184
CONCLUSIONES.....	191
BIBLIOGRAFÍA.....	197

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Esquema de los intermedios de replicación tempranos en los mecanismos de replicación plasmídica tipo theta y por desplazamiento de cadena (página 15)
- Figura 2. Dominios HUH de la clase Rep o Mob (página 20)
- Figura 3. Esquema de la participación de la proteína Rep en la RCR plasmídica (página 25)
- Figura 4. Mapa del plásmido pMV158 (página 26)
- Figura 5. Representación esquemática del *dso* de pMV158 (página 27)
- Figura 6. Estructura tridimensional de RepB por cristalografía de rayos X (página 29)
- Figura 7. Estructura tridimensional de RepB₆ (página 31)
- Figura 8. Esquema de un ensayo típico con el sistema Biacore y sensograma correspondiente (página 81)
- Figura 9. Esquema del *dso* y de los oligos representativos de las repeticiones directas (página 91)
- Figura 10. Determinación mediante EMSA de la afinidad de OBD y RepB₆ por las diferentes repeticiones directas del *dso* (página 95)
- Figura 11. Determinación mediante SPR de la afinidad de OBD/RepB₆ por las diferentes repeticiones directas del *dso* (página 96)
- Figura 12. Análisis por EMSA de la interacción entre una DDR y OBD con y sin etiqueta His₆ (página 98)
- Figura 13. Identificación de los contactos de OBD (con y sin His₆) con el DNA del locus *bind* y comparación con los que se identificaron para RepB₆. (página 100)
- Figura 14. Primera aproximación para la identificación de las regiones de RepB implicadas en la unión a DNA (página 102)
- Figura 15. Estructura cristalina por difracción de rayos X del complejo OBD-DDR (página 104)
- Figura 16. Análisis mediante EMSA de la interacción entre una DDR y los diferentes mutantes de unión del OBD (página 107)
- Figura 17. Experimentos de EMSA para el análisis de la interacción de OBD con IR-I. (página 108)
- Figura 18. Experimento para determinar si el oligo hIR-I presenta apareamientos inter- o intra-moleculares (página 110)
- Figura 19. Análisis por SPR de la interacción entre OBD/RepB₆ y los oligos fx23mb y hIR-I.1mb (página 111)
- Figura 20. Experimento de estabilidad del complejo OBD-DDRC (página 113)
- Figura 21. Análisis de la cooperatividad de unión de OBD a las DDRs (página 116)

Figura 22. Esquema de las modificaciones en la distancia y cambio de fase entre PDRs y DDRs (página 118)

Figura 23. Análisis de las actividades endonucleolítica y de transferencia de cadena de OBD y RepB (página 123)

Figura 24. Detección del aducto covalente OBD-DNA y RepB₆-DNA (página 126)

Figura 25. Detección del complejo covalente formado entre OBD/OBD^{Y99A}/RepB₆ y DNA mediante *Western Blot* (página 127)

Figura 26. Detección del complejo covalente sometido a tratamiento con proteinasa K (página 129)

Figura 27. Estabilización del aducto covalente OBD-DNA (página 132)

Figura 28. Análisis de los productos de la actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes (página 137)

Figura 29. Análisis de la capacidad de unión a dsDNA y la actividad enzimática de los mutantes de OBD con sustituciones en el centro activo en comparación con OBD nativa (página 140)

Figura 30. Análisis del patrón de productos resultante de la actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes a lo largo del tiempo, a una concentración de NaCl de 430 mM (página 142)

Figura 31. Análisis del patrón de productos resultante de la actividad enzimática a lo largo del tiempo para OBD y las formas mutantes OBD^{Y99A} y OBD^{H102A} a una concentración de NaCl de 130 mM (página 144)

Figura 32. Análisis de la actividad de RepB₆ sobre un oligo ssDNA a diferentes temperaturas en presencia de un exceso de Mn²⁺ (página 146)

Figura 33. Análisis de la estabilidad térmica de RepB (página 147)

Figura 34. Cambios en la estructura secundaria de RepB₆ inducidos por aumento de la temperatura (página 149)

Figura 35. Actividades de corte y de transferencia de cadena de OBD nativa y OBD^{D42A} sobre oligos monocatenarios en presencia de diferentes concentraciones de Mn²⁺ (página 151)

Figura 36. Actividades de corte y de transferencia de cadena de RepB₆ sobre oligos monocatenarios en presencia de diferentes concentraciones de Mn²⁺ (página 152)

Figura 37. Variación del patrón de productos resultantes de la reacción enzimática a lo largo del tiempo tanto para OBD como para RepB₆ (página 153)

Figura 38. Sustitución parcial de Mn²⁺ por otros cationes e implicaciones en la actividad enzimática de RepB₆ (página 154)

Figura 39. Actividad helicasa de PcrA^{Spn} sobre el oligo Top3tailCy5-Bot3taildu (página 158)

Figura 40. Análisis de la interacción entre RepB₆ y la versión truncada de PcrA (PcrAN) por equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación analítica (página 160)

Figura 41. Análisis de la interacción simultánea de PcrASpn y RepB₆ con los oligos DDRtailb y DDRb mediante SPR (página 163)

Figura 42. Superposición de las estructuras de OBD y RepB (página 169)

Figura 43. Resumen de los contactos de RepB₆ con la secuencia PDR del locus *nic* (página 170)

Figura 44. Modelo del ensamblaje de la Rep de AAV (página 172)

Figura 45. Análisis comparativo de la estructura secundaria, predicha u observada, de la región bisagra de RepB y de proteínas Rep virales (página 174)

Figura 46. Detalle de la cavidad catalítica de la estructura atómica de RepB (página 180)

Figura 47. Comparación de las estructuras de la helicasa E1 de papillomavirus y RepB₆ (página 183)

Figura 48. Modelo para la replicación de pMV158 (página 188)

Tabla 1. Estirpes bacterianas (página 42)

Tabla 2. Plásmidos (página 42)

Tabla 3. Oligos (página 48)

Tabla 4. Tampones (página 53)

Tabla 5. Modelo de cooperatividad (página 70)

Tabla 6. K_d y B_{max}, determinadas mediante ensayos de EMSA, para la interacción entre OBD y los oligos que simulan las repeticiones del *dso* (página 93)

Tabla 7. Valores aproximados de K_d y B_{max}, determinados mediante ensayos de SPR, para la interacción entre OBD/RepB₆ y los oligos que simulan las repeticiones del *dso* (página 97)

Tabla 8. K_d y B_{max}, determinadas mediante ensayos de EMSA, para la interacción entre las formas mutantes de OBD y el oligo 1DDRf (página 106)

Tabla 9. Valores aproximados de K_d y B_{max}, determinados mediante ensayos de SPR, para la interacción entre OBD/RepB₆ y los oligos fx23mb y hIR-I.1mb (página 112)

Tabla 10. Patrón de productos resultantes de la actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes en el centro activo (página 138)

Tabla 11. Actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes en el centro activo (página 138)

Tabla 12. Masas moleculares promedio de las especies proteicas en solución RepB₆ y PcrASpn, determinadas mediante ensayos de equilibrio de sedimentación (página 160)

Tabla 13. Detección de especies macromoleculares en soluciones de RepB₆ y PcrA*Spn*, así como en sus mezclas, mediante ensayos de velocidad de sedimentación (página 161)

LISTA DE ABREVIATURAS:

A	Absorbancia
Ap	Ampicilina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
Cm	Cloranfenicol
DMS	Dimetilsulfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EG	Etilenglicol
Em	Eritromicina
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
Km	Kanamicina
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótido
oligo	Oligo-desoxirribonucleótido
PAA	Poliacrilamida
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PSA	Persulfato amónico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
ssDNA	DNA de cadena sencilla
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
Tris	Trihidroximetil-amino-metano
UV	Ultravioleta

RESUMEN

El plásmido pMV158 es el prototipo de una amplia familia de plásmidos que emplean el mecanismo de replicación por círculo rodante (RCR) para duplicar su DNA. pMV158 es un plásmido movilizable, que determina resistencia a tetraciclina y exhibe una enorme promiscuidad, como queda demostrado por su capacidad para colonizar una gran variedad de especies bacterianas de diversos filos. Por esta razón, el estudio de sus características replicativas tiene un evidente interés tanto desde el punto de vista clínico como por el conocimiento de las bases moleculares que subyacen en este proceso. Esta promiscuidad debe estar estrechamente relacionada con las características de la proteína iniciadora de la replicación, RepB, codificada por el propio plásmido, la cual presenta una conformación hexamérica singular entre las proteínas iniciadoras de RCR de plásmidos y bacteriófagos, y que la asemeja a las proteínas Rep de virus de animales y plantas. Por todo ello, la presente tesis pretende ahondar en el conocimiento de RepB, así como en el de su papel en el proceso replicativo de pMV158. Con este fin se establecieron los siguientes objetivos: caracterización de la actividad enzimática de RepB, análisis de la interacción de RepB con el origen de replicación de doble cadena de pMV158 (*dso*), estudio de la posible interacción entre RepB y PcrA de *Streptococcus pneumoniae*, y elaboración de un modelo para el proceso replicativo de pMV158.

RepB es una endonucleasa HUH constituida por dos dominios, el dominio N-terminal (OBD), responsable de la actividad enzimática y de la unión al dsDNA específico del *dso*, y el dominio C-terminal (OD), implicado en la hexamerización de la proteína. En este trabajo de tesis hemos estudiado su actividad enzimática en el contexto de la replicación de pMV158. Además de la tirosina Y99, que hasta ahora se consideraba el único residuo catalítico, hemos identificado otros aminoácidos implicados en la catálisis sobre el ssDNA, entre los que destaca H102 como un posible segundo residuo catalítico. La formación de un aducto covalente entre RepB y el extremo 5' del DNA generado por la actividad endonucleasa de la proteína durante la etapa de la iniciación es esencial para el mecanismo replicativo del plásmido. Aunque este aducto se consideraba de naturaleza lábil, ya que no se había logrado su detección, finalmente hemos sido capaces de identificarlo y analizar su estabilidad bajo distintas condiciones. Otra de las contribuciones destacables de este trabajo ha sido desvelar la importancia del catión del centro activo tanto en la actividad catalítica como en la termoestabilización de la estructura de RepB.

Para dilucidar los primeros pasos de la replicación de pMV158 hemos caracterizado las interacciones que se establecen entre RepB y los distintos elementos

del *dso*. Dichas interacciones no se limitan a conectar enzima y sustrato, sino que parecen fundamentales para el ensamblaje de un replisoma funcional.

En el mecanismo RCR la actividad helicasa sobre el dsDNA plasmídico es necesaria para desplazar la cadena parental que sufrió la rotura endonucleolítica inicial mediada por Rep, por lo que el replisoma de pMV158 debe incluir una proteína que desempeñe dicha función helicasa. La helicasa bacteriana PcrA, que interviene en la replicación de otros plásmidos RCR prototípicos de Firmicutes, como pT181 o pC221, podría formar parte del replisoma de pMV158 y ayudar al avance de la horquilla replicativa. Los estudios encaminados a detectar la interacción entre RepB y PcrA *Spn*, codificada por el cromosoma del huésped neumocócico de pMV158, concluyeron que ambas proteínas no son capaces de formar un complejo estable, aunque no descartan que puedan unirse simultáneamente a secuencias de DNA adyacentes de forma que la helicasa bacteriana pueda ejercer su función de separación de las dos hebras parentales. Alternativamente, y teniendo en cuenta la singular conformación de RepB, cabría la posibilidad de que la replicación de pMV158 fuera independiente de la presencia de PcrA y que la separación de las dos cadenas parentales del DNA plasmídico se efectuara, con la contribución de la actividad motora de la DNA polimerasa, gracias al enhebrado del hexámero de RepB en una de ellas. Esta independencia de la helicasa de la célula hospedadora, o la dispensabilidad alternativa de interacciones muy estrictas entre RepB y PcrA, contribuiría, en último término, a la promiscuidad del sistema.

Por último se ha establecido un modelo para la replicación de pMV158 en el que se han integrado resultados de este trabajo y de otros anteriores. En él se cumplen los requerimientos propios de la RCR plasmídica y se muestran las peculiaridades del sistema de replicación de pMV158.

SUMMARY

The plasmid pMV158 is the prototype of a vast family of plasmids replicating by the rolling-circle mechanism (RCR). PMV158 is a mobilizable plasmid that determines tetracycline resistance and exhibits an enormous promiscuity, as shown by its ability to colonize a great diversity of bacterial species from different phyla. For this reason, the study of its replicative characteristics has an obvious interest from both clinical and scientific points of view, as it can contribute to unveil of the underlying molecular bases of promiscuous replication. The high promiscuity of pMV158 should be closely related to the features of the plasmid-encoded replication initiator RepB protein, which exhibits a hexameric conformation that is unique among initiator proteins of RCR plasmids and bacteriophages and rather resembles that of Rep proteins from animal and plant viruses. Therefore, this thesis aims to delve into the knowledge of RepB as well as into its role in the replicative process of pMV158. In this respect, the following objectives were established: characterization of the enzymatic activity of RepB, analysis of the interaction between RepB and the double-strand origin (*dso*) of pMV158, study of the hypothetical interaction between RepB and PcrA from *Streptococcus pneumoniae*, and development of a model for the replicative process of pMV158.

RepB belongs to the HUH endonuclease superfamily. Each RepB protomer comprises an N-terminal domain (OBD) that retains the ability of specific DNA binding as well as the enzymatic activity of RepB, and a C-terminal domain (OD) responsible for the hexamerization of the protein. In this thesis work we have studied the enzymatic activity of RepB/OBD in the context of the replication of pMV158. Besides the tyrosine Y99, so far considered as the only catalytic residue, we have identified other aminoacids involved in the catalysis over the ssDNA, among which stands out histidine H102 as a potential second catalytic residue. Formation of a covalent link between RepB and the DNA 5' end generated by the endonuclease activity of the protein during the initiation step is essential for the replicative mechanism of the plasmid. Although this protein-DNA covalent adduct was thought to be extremely labile, finally we have been able to detect it and to analyze its stability under different conditions. Another remarkable contribution of this work is the unveiling of the importance of the cation in the active center not only in the catalytic activity but also in the thermostability of the protein structure.

To elucidate the first steps in the replication of pMV158 we have characterized the interactions established between RepB and different elements of the *dso*. Such interactions are not limited to connecting enzyme and substrate, but they appear to be fundamental for the assembling of a functional replisome. In the RCR mechanism a

helicase activity is required in order to displace the parental strand that bore the initial RepB-mediated endonucleolytic cleavage, so that the pMV158 replisome must include a protein performing this helicase function. The bacterial helicase PcrA, which is involved in the replication of other prototypic RCR plasmids from Firmicutes, like pT181 or pC221, could be part of the pMV158 replisome, thus boosting the progression of the replicative fork. The studies conducted to detect the interaction between RepB and PcrA*Spn*, encoded by the chromosome of the pneumococcal host of pMV158, concluded that the two proteins were not able to form a stable complex, although we cannot discard the simultaneous binding of both proteins to adjacent DNA sequences so that the bacterial helicase can accomplish the separation of the two parental strands. An alternative hypothesis that takes into account the singular conformation of RepB is that the replication of pMV158 would be independent of the presence of PcrA, and that the separation of the two plasmid DNA parental strands would be conducted, with the contribution of the motor activity of DNA polymerase, by the RepB hexamer through whose central channel one of the DNA strands would become threaded. Thus, this independency of the bacterial helicase, or the alternative dispensability of highly stringent interactions between RepB and PcrA, would contribute, ultimately, to the promiscuity of the system.

Finally, integrating results from this work and previous ones, a model for the replication of pMV158 has been developed. This model meets the requirements of the RCR mechanism for plasmids and shows the peculiarities of the replication system of pMV158.

INTRODUCCIÓN

1. PLÁSMIDOS BACTERIANOS

1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN SEGÚN MECANISMO DE REPLICACIÓN

Los plásmidos bacterianos son elementos extracromosómicos de DNA bicatenario que replican de modo autónomo y autocontrolado, sirviéndose tanto de la maquinaria del hospedador como de factores codificados por ellos mismos. Su material genético no es, en general, esencial para el hospedador, pero suele determinar características que le confieren una potencial ventaja adaptativa. Dentro del huésped, los plásmidos son capaces de incorporar y perder genes por recombinación homóloga o transposición. Este flujo de genes también implica un intercambio genético entre poblaciones bacterianas.

El tamaño de los plásmidos bacterianos varía considerablemente, desde unos cientos de bases hasta cientos de kilobases (kb), y pueden constituir una cantidad sustancial del contenido genético de un organismo, representando más del 25% del material genético en algunos miembros de *Archaea* (Holmes, Pfeifer et al. 1995). Independientemente de las dimensiones del plásmido, existe una región indispensable de no más de 3 kb, denominada replicón básico, que recoge los siguientes genes y secuencias necesarias para la replicación plasmídica y su control: un origen de replicación (*ori*); los genes implicados en el control de la replicación y, con frecuencia, uno o varios genes *rep*, que codifican proteínas Rep necesarias para iniciar la replicación.

Existen tres mecanismos de replicación para los plásmidos circulares: tipo theta, por desplazamiento de hebra y por círculo rodante.

La replicación tipo theta ha sido extensamente estudiada en bacterias Gram-negativas, aunque también se ha descrito en plásmidos aislados de bacterias Gram-positivas del grupo estreptocócico/estafilocócico Inc18 (Bruand, Ehrlich et al. 1991), en algunos replicones de lactococos (Kiewiet, Bron et al. 1993), y al menos en un plásmido de *Bacillus subtilis* (Meijer, de Boer et al. 1995). Los plásmidos que replican por este mecanismo pueden presentar una o varias de las siguientes características: regiones ricas en bases A+T, que favorecen la separación de las hebras y la unión de varios factores de iniciación; cajas *dnaA*, donde la proteína iniciadora cromosómica DnaA se une; múltiples secuencias de metilación Dam; sitios de unión para factores

que participan a nivel de arquitectura del DNA, y sitios de unión a los que se une la proteína iniciadora plasmídica, implicados en la replicación y su control. Aunque la síntesis de DNA es continua en la hebra líder y discontinua sobre su complementaria, la formación de las dos hebras durante la elongación sí está acoplada (figura 1). Por otro lado, la síntesis puede empezar en uno o varios orígenes y puede ser uni o bidireccional. En el inicio del proceso replicativo se produce el ensamblaje de la maquinaria de replicación en torno al origen; algunas de las proteínas que forman parte de dicha maquinaria son la DNA polimerasa III, la helicasa DnaB, la girasa y la primasa. También participan las proteínas SSB de unión a DNA de cadena sencilla. La mayoría de los replicones del tipo theta requieren, además de una proteína Rep codificada por el propio plásmido, de la proteína DnaA del huésped. Algunos ejemplos de plásmidos que replican por el mecanismo theta son pSC101, P1, RK2, R6K, R1, ColE2, ColE3 y pAM β 1. La replicación comienza con la síntesis de un *primer* de RNA llevada a cabo por la RNA polimerasa o por la primasa del huésped; a continuación la DNA polimerasa III se encarga de la elongación del DNA. Sin embargo, en algunos casos, como ColE1, ColE2, pAM β 1, pCU1 y pJDB23, la DNA polimerasa I participa en la síntesis del DNA en las etapas tempranas (Bruand, Le Chatelier et al. 1993). La terminación de la replicación viene determinada por secuencias específicas, tales como la secuencia *ter* en el plásmido R6K, a la que se une la proteína Tus para promover la terminación de la replicación.

Respecto a la replicación por desplazamiento de cadena, los ejemplos mejor conocidos son los plásmidos promiscuos pertenecientes al grupo IncQ, cuyo prototipo es RSF1010. Su origen de replicación presenta tres iterones idénticos de 20 pb, una región rica en GC de 28 pb, una región rica en AT de 31 pb y, a continuación, dos pequeñas secuencias palindrómicas que contienen los orígenes de replicación de cadena sencilla *ssiA* y *ssiB*, localizados uno en cada hebra. La síntesis de cada una de las hebras de DNA procede de manera continua. La iniciación desde los sitios *ssi* sucede en direcciones opuestas y puede ocurrir independientemente, ya que la cadena que no es copiada es desplazada (figura 1) (del Solar, Giraldo et al. 1998). Los miembros de este grupo requieren tres proteínas codificadas por el propio plásmido para iniciar su replicación: una proteína iniciadora, una helicasa y una primasa. En el caso de RSF1010, la proteína iniciadora RepC interacciona específicamente con los iterones y, probablemente, con la helicasa RepA, promoviendo la exposición de los sitios *ssi* en ssDNA y, como consecuencia, el cebado de la síntesis de DNA en estos orígenes mediante la primasa RepB.

Por ser el mecanismo de círculo rodante (RC) el utilizado para la replicación del plásmido pMV158, la cual es objeto de estudio en esta tesis, sus características se exponen en detalle más adelante.

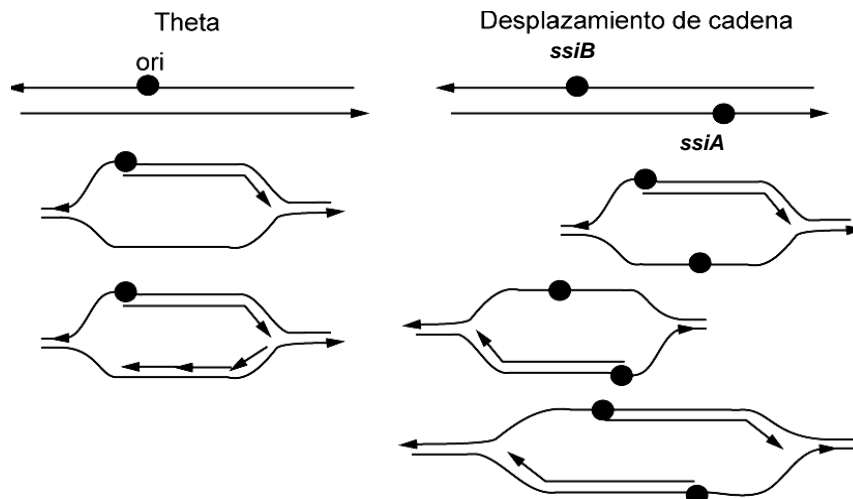


Figura 1. **Esquema de los intermediarios de replicación tempranos en los mecanismos de replicación plasmídica tipo theta y por desplazamiento de cadena.** En el mecanismo tipo theta la síntesis de DNA es continua en una de las cadenas (líder) y discontinua en la otra (retrasada), aunque la replicación de ambas cadenas está acoplada. En el mecanismo por desplazamiento de cadena, la replicación puede comenzar independientemente desde cada uno de los orígenes (*ssiB* y *ssiA*), situados en cada una de las cadenas. La replicación procede desde estos orígenes de manera continua y en direcciones opuestas. La cadena que no se copia es desplazada durante la replicación. Esta figura fue extraída de (Espinosa, Cohen et al. 2000).

1.2. AMPLITUD DE RANGO DE HUESPED

El rango de huésped de un plásmido hace referencia al conjunto de bacterias en las que un plásmido puede mantenerse tras ser transferido. Viene determinado por factores tales como el sistema de conjugación o el mecanismo de replicación. El rango de huésped puede diferir ampliamente de un plásmido a otro; existen plásmidos con un rango de huésped muy restringido y otros que poseen un amplio rango, denominados por ello plásmidos promiscuos. En consecuencia, el uso de la clasificación de plásmidos basada en la amplitud de su rango de huésped está muy extendido.

Existen varias estrategias que proporcionan a un plásmido un amplio rango de hospedador; a continuación se describen algunos ejemplos (Jain and Srivastava

2013). La presencia de múltiples orígenes de replicación aumenta las posibilidades de poseer el adecuado para un tipo de huésped dado. Este es el caso de pJD4, que posee tres orígenes de replicación agrupados, *ori1*, *ori2* y *ori3*, y dos genes que codifican las proteínas iniciadoras de replicación RepB y RepA, necesarias para el funcionamiento de *ori2* u *ori1* y *ori3*, respectivamente. Las estructuras del origen también juegan un papel importante en la amplitud de rango de huésped. Por ejemplo, la presencia de tres iterones adicionales en RK2 estabiliza su mantenimiento en *Pseudomonas putida*. Una menor dependencia de los factores de replicación del huésped también resulta una estrategia muy eficaz. Por ejemplo, el plásmido RSF1010 contiene los genes *repA*, *repB* y *repC*; el producto de *repA* tiene actividad helicasa, el producto de *repC* abre la región del origen haciéndola accesible a RepA, y *repB* codifica una primasa.

1.3. CONTROL DE LA REPLICACIÓN

La replicación del DNA plasmídico, a diferencia del viral, es autorregulada. Un plásmido concreto, una vez establecido en la bacteria correspondiente, se mantiene con un número de copias característico, que depende del huésped y de las condiciones de crecimiento, siendo capaz de detectar y corregir las fluctuaciones de su número de copias en células individuales.

El control del número de copias se produce en la etapa de iniciación, mediante factores codificados por el propio plásmido (Novick 1987). Las principales estrategias seguidas para dicha regulación son las siguientes: pequeños RNA contratranscritos (ctRNAs); repeticiones directas de DNA (iterones), y la acción combinada de una proteína represora y un ctRNA (del Solar and Espinosa 2000). El efecto inhibidor de los ctRNAs se debe a su apareamiento con RNAs esenciales para la replicación, como por ejemplo el mRNA de la proteína iniciadora de la replicación. La función de los iterones es más compleja, ya que constituyen un sitio de unión para las proteínas Rep, y son esenciales tanto para la iniciación como para la regulación de la replicación. El control negativo de los plásmidos con iterones se realiza a tres niveles: autorregulación de la proteína Rep, titulación de la proteína Rep, disminuyendo su disponibilidad, y desactivación del origen por impedimentos estéricos al interaccionar entre sí varias proteínas Rep unidas a iterones (mecanismo de *handcuffing*).

2. REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR EL MECANISMO RC

La replicación de DNA por círculo rodante (RCR) es un mecanismo observado por primera vez en colifagos de cadena sencilla y posteriormente en plásmidos bacterianos, más frecuentemente en bacterias Gram-positivas pero también en Gram-negativas (del Solar, Moscoso et al. 1993), y en los de algunas arqueas y mitocondrias de plantas, así como en virus de las familias *Parvoviridae*, *Geminiviridae* (Backert, Meibner et al. 1997) y *Genomoviridae* (Krupovic, Ghabrial et al. 2016). En la actualidad ya se han identificado un gran número de plásmidos RCR que pueden ser clasificados en más de 12 familias, según su homología a nivel de proteína iniciadora y del origen de replicación de doble cadena. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes en la replicación RC sólo se han estudiado con detalle en los plásmidos de estafilococos pT181/pC221 (Thomas, Balson et al. 1990, Khan 2005) y pC194/pUB110 (Noirot-Gros, Bidnenko et al. 1994), y en el plásmido estreptocócico promiscuo pMV158 (del Solar, Giraldo et al. 1998).

El rango de tamaño de los plásmidos RCR es muy amplio, desde plásmidos tan pequeños como pRQ7, de 846 pb (Yu and Noll 1997), hasta plásmidos tan grandes como pCG4, que casi alcanza 30 kb (Nesvera, Hochmannova et al. 1998). El número de copias por equivalente cromosómico bacteriano de plásmidos RCR oscila entre 10 y 30 copias, en función del plásmido, el huésped y las condiciones de crecimiento.

Los plásmidos RCR se caracterizan por estar compuestos de módulos genéticos intercambiables (del Solar, Moscoso et al. 1993), de los cuales el único esencial es el módulo LIC (*Leading-strand Initiation and Control*), responsable de la iniciación de la replicación y de su control. El replicón debe contener al menos el origen de replicación de doble cadena (*dso*), el origen de replicación de cadena sencilla (*sso*) y los genes codificantes de la proteína iniciadora de la replicación (Rep) y de los elementos de control. Adicionalmente, los plásmidos RCR pueden contener módulos que confieran ventaja adaptativa a la célula huésped, o módulos que contribuyan a su propia transferencia entre células, como es el caso del módulo MOB, implicado en la movilización conjugativa, que está constituido por el origen de transferencia (*oriT*) y el gen *mob*, codificante de la proteína relaxasa.

2.1. EL ORIGEN DE REPLICACIÓN DE DOBLE CADENA (*dso*) DE PLÁSMIDOS RCR

Los *dsos* de los plásmidos RCR pueden situarse a 5' del gen *rep*, tal y como sucede en las familias de pC194, pMV158 y pSN2, embebido en la propia secuencia codificante de Rep, como en la familia de pT181, o a 3' de esta, al igual que en la familia pTX14-2. Generalmente la longitud del *dso* no supera los 100 pb y se puede dividir funcionalmente en dos regiones: el locus *bind*, donde Rep se une específicamente, y el locus *nic*, que contiene la secuencia específica requerida para la actividad endonucleolítica y de transferencia de cadena de RepB; este último es el más conservado entre los replicones de una misma familia. El hecho de que el locus *nic* esté conservado y que el *bind* presente diferencias implica que las proteínas Rep de una misma familia deben tener un motivo catalítico común para el corte y posterior sellado del enlace fosfodiéster, mientras que el motivo responsable de la unión al *dso* difiere en cada proteína (Ruiz-Masó, Machón et al. 2015). En familias como las de pT181 o pC194, los locus *bind* y *nic* se encuentran adyacentes; en otras, como la de pMV158, están separados por hasta 100 pb (del Solar, Moscoso et al. 1993). Aunque ambos loci son esenciales para la iniciación de la replicación, sólo el locus *nic* es necesario en el proceso de terminación. Una característica típica del locus *nic* es la presencia de estructuras secundarias, tales como horquillas o cruciformes, que localizan la secuencia de corte en la región desapareada; algunos ejemplos son las estructuras IR II en pT181 e IR-I en pMV158. Este hecho es relevante ya que la actividad endonucleolítica de Rep únicamente se ejerce sobre DNA monocatenario, lo que explica el requerimiento absoluto de DNA superenrollado como sustrato replicativo (del Solar, Díaz et al. 1987, Noirot, Bargonetti et al. 1990). Lo más característico del locus *bind* son las repeticiones de secuencia a las que se une Rep, que pueden ser invertidas, por ejemplo en la familia de pC194, o directas, como en la familia de pMV158.

2.2. LAS PROTEÍNAS Rep INICIADORAS DE LA REPLICACIÓN POR EL MECANISMO RC

Las proteínas Rep iniciadoras de la replicación por RC se encuentran en plásmidos bacterianos, colifagos y virus de ssDNA de animales y plantas (como por ejemplo geminivirus, parvovirus y genomovirus). La mayoría de las proteínas Rep que están involucradas en la replicación RC forman parte de la superfamilia de endonucleasas HUH, a la que también pertenecen otras proteínas como relaxasas (o

Mob) y transposasas (Ilyina and Koonin 1992). Esta superfamilia está ampliamente extendida y presente en los tres dominios de la vida. La principal función de las endonucleasas HUH es el procesamiento de elementos genéticos móviles durante los procesos de replicación y conjugación, mediante el corte y cierre específico de sitio de ssDNA. También cabe mencionar los procesos de transposición llevados a cabo por las transposasas. Adicionalmente se han observado otras funciones relacionadas con el procesamiento de secuencias.

La principal característica de esta superfamilia es la presencia de un motivo HUH, compuesto por dos histidinas separadas por un residuo hidrofóbico, y de un motivo Y, compuesto por 1 o 2 tirosinas catalíticas separadas por un número variable de residuos. La actividad de las endonucleasas HUH precisa de un catión divalente que polarice el enlace fosfodiéster a escindir facilitando el corte. Los cationes Mg^{2+} o Mn^{2+} se consideran los cofactores fisiológicos. Las histidinas del dominio HUH constituyen 2 de los 3 ligandos necesarios para la coordinación del metal; el tercer ligando varía dentro de la superfamilia, puede ser glutamina, aspartato, histidina o glicina. Estructuralmente el dominio HUH se caracteriza por contener una lámina β , constituida por 5 hebras antiparalelas, flanqueada por un número variable de hélices α . La tirosina activa se localiza en una de estas hélices α y el motivo HUH se localiza en el medio de la lámina β (Chandler, de la Cruz et al. 2013) (figura 2).

Curiosamente, el motivo de unión a metal HUH no está presente en las proteínas Rep de plásmidos de la familia pT181 o de fagos filamentosos de ssDNA, aunque en ambos casos se requiere la presencia de un catión divalente para la actividad enzimática. Respecto a pT181 y pC221, son los residuos Y en las posiciones 191 o 188 de las respectivas proteínas Rep los responsables de la rotura del enlace fosfodiéster del dinucleótido 5'-ApT-3' de la secuencia de corte del *dso* (Thomas, Balson et al. 1990). Pese a que no se ha conseguido determinar la estructura cristalográfica completa de ninguna Rep de la familia de pT181, sí se ha obtenido información de la estructura de la proteína quimérica RepDC, constituida por el dominio catalítico de RepD, proteína iniciadora de pC221, y el dominio de unión a DNA de RepC, proteína iniciadora de pT181, y más recientemente se ha resuelto la estructura del dominio catalítico de RepSTK1, proteína iniciadora de la replicación del plásmido RCR pSTK1, así como la estructura de las proteínas quiméricas RepDE y RepDN, constituidas por el dominio catalítico de RepD y el dominio de unión a DNA de RepE, proteína iniciadora de pS194, o de RepN, proteína iniciadora de pCW7,

respectivamente, siendo el plegamiento de estas proteínas muy diferente al de las endonucleasas HUH (Carr, Phillips et al. 2016).

Debido a la gran variedad de procesos en los que están involucradas las endonucleasas HUH, no es de extrañar la presencia de dominios anexos al HUH. Son recurrentes los dominios helicasa, primasa, de unión al Zn y de multimerización, aunque en ocasiones su función es desconocida (Chandler, de la Cruz et al. 2013).

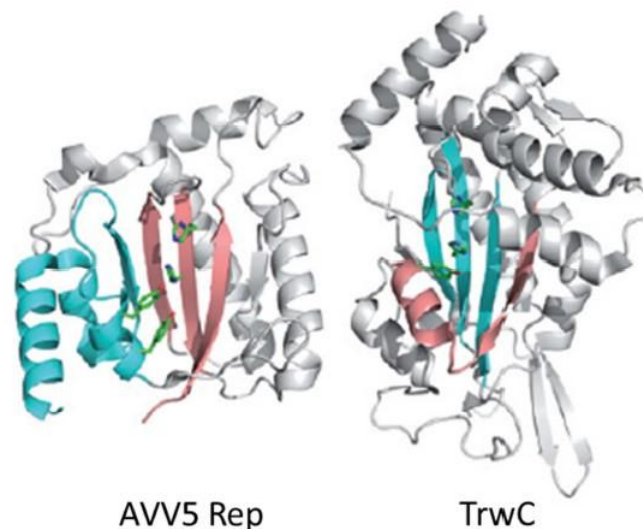


Figura 2. **Dominios HUH de la clase Rep o Mob.** La clase Rep se encuentra representada por el dominio de la proteína Rep del virus AAV5, y la clase Mob por el dominio de la proteína TrwC del plásmido R388. Ambos presentan una lámina β constituida por cinco hebras ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ para Rep y $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$) con un núcleo $\beta\alpha\beta$ que lleva el motivo HUH en la hebra central. En rosa se indican las regiones más amino-terminales de la secuencia primaria; en celeste se indican aquellas más carboxi-terminales. Imagen tomada de (Chandler, de la Cruz et al. 2013).

Para iniciar la replicación, las proteínas Rep tienen que interactuar con el DNA del *dso*. Dicha interacción parece ser responsabilidad del dominio N-terminal. Por ejemplo, en la proteína Rep del plásmido pJB01 se han realizado estudios de delección que demuestran que la parte N-terminal de la proteína desempeña un papel crucial en la actividad de tipo topoisomerasa I y en la unión específica a DNA (Kim, Jeong et al. 2006). De manera similar, el dominio N-terminal de la proteína AL1, que es un iniciador de la replicación RC de geminivirus, es necesario para las actividades de unión específica y de corte del DNA (Orozco, Miller et al. 1997). Además, las estructuras resueltas de los complejos proteína-DNA correspondientes a los dominios N-terminales de las proteínas Rep de AAV-5 y E1 de papilomavirus, que en ambos casos presentan el sándwich α/β característico del dominio HUH, han mostrado que el

reconocimiento del dsDNA está realizado por elementos estructurales que acompañan a la lámina β central del sándwich α/β . Sin embargo, cabe destacar que E1 no contiene ni el motivo HUH ni la Y catalítica y de hecho no posee actividad endonucleasa (Enemark, Chen et al. 2000, Hickman, Ronning et al. 2004).

En la iniciación de la replicación de plásmidos RCR, tras la interacción específica de Rep con el *dso*, entra en escena la actividad endonucleolítica de la proteína, que corta el ssDNA de la secuencia específica de corte del locus *nic* mediante el ataque nucleofílico de una tirosina activa. Como consecuencia del ataque nucleofílico, la proteína Rep queda unida covalentemente al extremo 5'-P, mientras que el extremo 3'-OH libre sirve de cebador para que las proteínas replicativas del huésped inicien la síntesis de la cadena líder. En la terminación se produce un segundo corte en el sitio específico reconstituido mediado por la actividad endonucleolítica de la proteína y, a continuación, la actividad de transferencia de cadena cataliza, mediante una reacción de transesterificación, la circularización de la cadena parental cortada en la etapa de iniciación de la replicación y desplazada como ssDNA durante la elongación de la cadena líder. La reacción enzimática global es isoenergética, ya que la energía procedente de la rotura del enlace fosfodiéster se conserva en forma de enlace covalente entre el residuo activo y el extremo 5'-P del DNA generado en el corte durante el inicio de la replicación, permitiendo la transferencia de cadena en el sitio de corte durante la etapa de terminación. Las proteínas Rep de elementos RCR deben presentar en su forma activa dos residuos catalíticos, ya que el corte en el sitio específico ocurre en la iniciación y en la terminación. Por ejemplo, en la iniciación de la replicación de pC194, RepA produce el corte a través de una tirosina, mientras que en la terminación es un glutamato el que corta (Noirot-Gros, Bidnenko et al. 1994). En el caso de la familia de pT181 se cree que las proteínas Rep actúan como dímeros, aportando cada monómero un residuo catalítico (Rasooly, Wang et al. 1994).

2.3. CONTROL DE LA REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS RCR

Existen dos estrategias principales para el control de la replicación de los plásmidos RCR, una de ellas involucra únicamente RNAs antisentido y la otra RNAs antisentido en combinación con una proteína represora de la transcripción. Un ejemplo de la primera clase son los plásmidos de la familia de pT181, en los que el control es ejercido únicamente por ctRNAs que son complementarios a la región 5' que no se traduce del mRNA *rep*. La unión del ctRNA al mRNA genera un cambio de

conformación en este que impide la correcta transcripción del gen *rep* (Novick 1989). La segunda clase fue descrita por primera vez para pMV158 y parece estar muy extendida en plásmidos de bacterias Gram-positivas. El control de la replicación en pMV158 se debe a la acción combinada de una proteína represora de la transcripción, CopG, y un pequeño ctRNA denominado RNAII. El represor CopG se une a su propio promotor y reprime la transcripción del operón *copG-repB* (Hernández-Arriaga, Rubio-Lepe et al. 2009). Por su parte, RNAII es complementario a una secuencia del mRNA *copG-repB* situada entre los genes *copG* y *repB*, inmediatamente a 5' de la región TIR (*translation initiation region*) de *repB*, y su unión inhibe la traducción de dicho gen (López-Aguilar, Romero-Lopez et al. 2015).

El control de la replicación del plásmido pUB110, además de producirse por la acción de dos RNAs antisentido, hace uso de un interesante mecanismo. En este plásmido la inactivación de la proteína iniciadora RepU, una vez finalizada la replicación, tiene lugar por la unión covalente de un pequeño oligonucleótido, de modo similar al caso de la proteína RepC de pT181, aunque en el caso de RepU se forma un hetero-oligómero de gran tamaño constituido por proteínas RepU inactivadas y sin inactivar que interfiere con el promotor de *repU*, situado a 3' del *dso* (Müller, Rojo et al. 1995).

También se han descrito elementos que influyen positivamente en el número de copias. En el plásmido pGA1 el control de la replicación viene dado, además de por un RNA antisentido, por unos efectores positivos de la replicación codificados por los genes *per* y *aes* (Venkova, Patek et al. 2001).

En el caso de las proteínas Rep de los plásmidos RCR, al igual que en el resto de Rep plasmídicas, resulta fundamental para mantener el número de copias que la proteína quede inactivada una vez finalizada la replicación de la cadena líder para que sea incapaz de iniciar un nuevo evento replicativo. El ejemplo más estudiado es el de pT181. Su proteína iniciadora de la replicación, RepC, se vuelve inactiva tras la replicación por quedar unida covalentemente, a través de la tirosina catalítica, a un pequeño fragmento de DNA replicado por segunda vez al final de la etapa de elongación y que corresponde a la secuencia localizada a 3' del sitio de corte (Rasooly and Novick 1993). De modo similar, Rep75, el iniciador de la replicación de pGT5, posee actividad nucleotidil transferasa terminal (NTT) específica de sitio que posibilita la inactivación de la proteína al quedar su tirosina catalítica unida a una adenina (Marsin and Forterre 1999).

2.4. LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE CADENA SENCILLA (*sso*) DE PLÁSMIDOS RCR

La síntesis de la cadena retrasada de los plásmidos RCR comienza en el origen de replicación de cadena sencilla, denominado *sso*, una región no codificante que contiene repeticiones invertidas imperfectas capaces de formar estructuras secundarias en ssDNA. Generalmente se localizan a una corta distancia a 5' del *dso*. El *sso* es reconocido generalmente por la RNA polimerasa, que sintetiza un pequeño RNA que actúa como *primer*. El *sso* no se conserva necesariamente entre los miembros de una familia de replicones, ya que la eficacia de su reconocimiento depende de la bacteria huésped. Existen 5 tipos principales: *ssoA*, *ssoT*, *ssoU*, *ssoW* y *ssoL*. Los orígenes tipo *ssoT* y *ssoU* son funcionales en un amplio rango de huéspedes, siendo *ssoU* el más promiscuo caracterizado hasta el momento, probablemente debido a su capacidad para unir RNA polimerasas de diferentes bacterias (Kramer, Espinosa et al. 1999). Es destacable el caso de pMV158, ya que es el único plásmido RCR con dos *ssos*, uno tipo *ssoA* (funcional en estreptococos) y otro *ssoU*; este aspecto debe colaborar en la elevada promiscuidad del plásmido.

Contrariamente a lo que sucede con el *dso*, la presencia de un *sso* no es indispensable para la replicación plasmídica, por lo que debe existir una vía alternativa para la replicación de la hebra rezagada. En cualquier caso, la eliminación del *sso* implica el aumento de intermedios replicativos de ssDNA así como, en general, la disminución del número de copias (formas dsDNA) y la inestabilidad segregacional del plásmido (del Solar, Puyet et al. 1987).

2.5. PROTEÍNAS DEL HUÉSPED INVOLUCRADAS EN RCR

Además de la RNA polimerasa, que reconoce el *sso* y sintetiza un *primer* para la síntesis de la hebra rezagada, existen otras proteínas del huésped requeridas para la replicación por el mecanismo RC. Las polimerasas son responsables de la replicación del DNA mediante la adición de nuevas bases complementarias. La DNA polimerasa I podría actuar en la síntesis de la hebra rezagada, tanto en el inicio como en la terminación (Díaz, Lacks et al. 1994). Por otra parte, la participación de la DNA polimerasa III parece ser imprescindible para la RCR (Majumder and Novick 1988). La replicación de DNA bicatenario requiere el desenrollamiento de la hélice y la generación de los intermedios de ssDNA. Las enzimas responsables de este proceso son las helicasas, cuya translocación a lo largo del ssDNA es posible gracias a que

poseen actividad ATPasa. Las helicasas bacterianas que participan en la RCR plasmídica son PcrA en bacterias Gram-positivas y UvrD en Gram-negativas. Otras proteínas implicadas en la RCR son las SSB, que participan tanto en la síntesis de la hebra líder como en la de la hebra rezagada. (Khan 2005, Ruiz-Masó, Machón et al. 2015).

2.6. EL MECANISMO DE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR RC Y LA IMPLICACIÓN DE Rep

El estudio de los plásmidos pT181, pC221, pC194, pUB110 y pMV158 ha resultado fundamental para la comprensión del mecanismo de la replicación por RC, cuyos aspectos generales se describen a continuación.

El mecanismo de replicación RC es unidireccional y, por no estar acopladas la síntesis de la cadena líder y la síntesis de la cadena retrasada, asimétrico. La replicación RC es iniciada por la proteína Rep al reconocer el *dso* en el DNA plasmídico superenrollado e introducir un corte específico de secuencia, quedando unida covalentemente al extremo 5'-P y generando un extremo 3'-OH libre. Este extremo libre es elongado por la DNA polimerasa III del huésped, que junto a Rep y a la helicasa del huésped constituyen el replisoma. La elongación se produce a medida que la hebra parental cortada es desplazada en sentido 5'→3' y cubierta por las proteínas SSB de unión a ssDNA. La terminación de la replicación de la cadena líder, que ocurre cuando la horquilla replicativa alcanza el *dso* reconstituido, da lugar a un intermedio replicativo de ssDNA circular, que constituye la “marca de fábrica” de los plásmidos RCR (te Riele, B. Michel et al. 1986, Gruss 1989), y a una molécula de dsDNA formada por la hebra parental intacta, la cual sirvió de molde para la síntesis de la cadena líder, y la hebra recién sintetizada. La síntesis de la hebra rezagada se inicia en el origen de replicación de cadena sencilla (*sso*) del intermedio replicativo de ssDNA y es llevada a cabo por las enzimas del huésped RNA polimerasa, DNA polimerasa I y DNA polimerasa III. Por último, las enzimas del huésped ligasa y girasa de DNA son responsables del cierre de los extremos de las moléculas de dsDNA y del superenrollamiento de los plásmidos resultantes.

Las proteínas Rep juegan un papel fundamental en el proceso replicativo RC. La proteína Rep debe ser capaz de interactuar con el *dso*, cortar en el sitio de corte, mantenerse unida covalentemente al DNA hasta completar la replicación de la cadena líder del plásmido y, en ese momento, mediante la actividad de corte y transferencia

de cadena, dar lugar a una molécula de ssDNA y otra de dsDNA. Por otra parte, al finalizar el proceso, Rep debe liberarse de forma inactiva para que la regulación del número de copias de plásmido en la célula sea posible (figura 3).

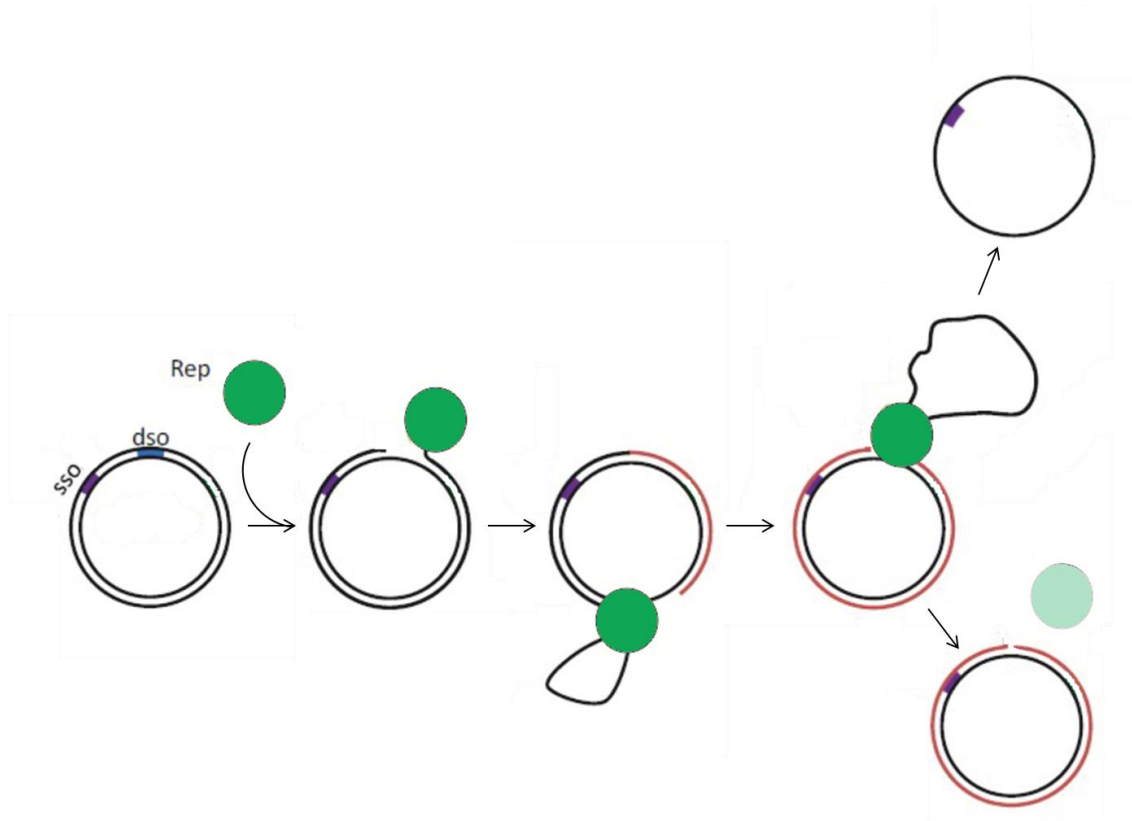


Figura 3. **Esquema de la participación de la proteína Rep en la RCR plasmídica.** En el comienzo de la replicación la proteína Rep es capaz de unirse específicamente al *dso* del plásmido e introducir un corte específico de secuencia, quedando unida covalentemente al extremo 5'-P y generando un extremo 3'-OH libre, que es elongado por proteínas del huésped a medida que la hebra parental cortada es desplazada en sentido 5'→3'. Cuando la horquilla de replicación alcanza el *dso* reconstituido, debido a la actividad de corte y transferencia de cadena de Rep, se genera una molécula de cadena sencilla y otra molécula bicatenaria. Por otra parte, al finalizar el proceso, la molécula Rep debe ser liberada en forma inactiva para que la regulación del número de copias de plásmido en la célula sea posible.

3. LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pMV158

El plásmido pMV158, aislado por primera vez de una estirpe patógena de *Streptococcus agalactiae*, es el prototipo de una familia compuesta por más de 100 plásmidos que utilizan el mecanismo RCR para duplicar su DNA y comparten homología significativa a nivel del *dso* y del gen *rep*. Este plásmido es capaz de colonizar gran variedad de especies bacterianas, tanto Gram-positivas como Gram-

negativas. Se ha encontrado en los filos Firmicutes, Actinobacteria y en la Gammaproteobacteria *Escherichia coli* (del Solar, Giraldo et al. 1998).

pMV158 tiene un tamaño de 5541 pb y presenta la siguiente organización (figura 4):

- Módulo LIC: Compuesto por el *dso* y los genes implicados en la iniciación/terminación y control de la replicación de la cadena líder, a saber: *repB*, *rnall* y *copG*. El promotor P_{cr} dirige la síntesis de un mRNA bicistrónico correspondiente a *copG* y *repB*, mientras que el promotor P_{ctII} es el responsable de la transcripción de *rnall*.
- Módulo DET: Determina la resistencia a tetraciclina.
- Módulo MOB: Encargado de la movilización conjugativa y constituido por el origen de transferencia (*oriT*) y el gen *mobM*, que codifica la relaxasa MobM.
- Dos orígenes de cadena retrasada (*ssoA* y *ssoU*).

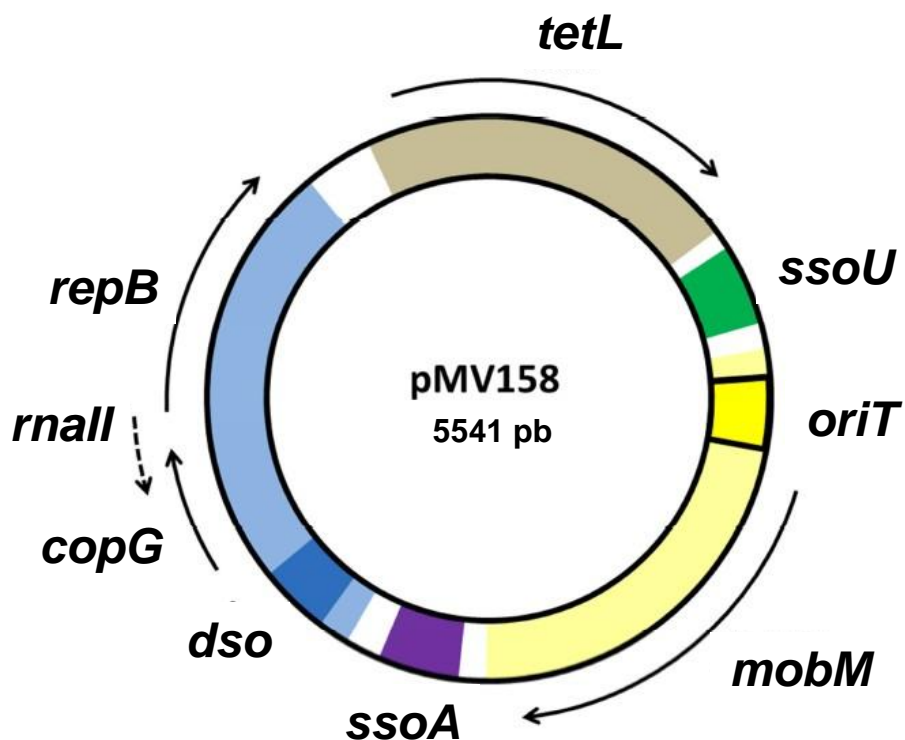


Figura 4. **Mapa del plásmido pMV158.** El módulo DET (marrón) otorga la resistencia a tetraciclina; el módulo MOB (amarillo) codifica la proteína responsable de la movilización conjugativa, MobM, y aloja al *oriT*; el módulo LIC (azul) contiene el operón *copG-repB*, el *dso* y el gen *mall*. Las flechas señalan la dirección de la transcripción de los genes que codifican las distintas proteínas (flechas continuas) y del *mall* (flecha discontinua). También se muestran los orígenes de cadena doble, *dso* (azul oscuro) y de cadena simple, *ssoA* (violeta) y *ssoU* (verde).

3.1. EL *dso* DE pMV158

El trabajo que nos ocupa busca en gran medida conocer detalladamente el papel que desempeña el *dso* en la replicación de pMV158. Tanto estructural como funcionalmente, el *dso* puede ser dividido en dos loci: el locus *bind*, compuesto por 3 repeticiones directas distales (DDR) de 11 pb cada una, es responsable del reconocimiento específico del origen por parte de RepB, mientras que el locus *nic*, que contiene la secuencia específica de corte en el espaciado de la repetición invertida IR-I así como dos repeticiones directas proximales (PDR) de 7 pb cada una, es el involucrado en el corte llevado a cabo por RepB en el inicio de la replicación plasmídica (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007) (figura 5). Una característica a destacar del *dso* de pMV158, compartida por el resto de miembros de la familia, es la separación entre el locus *nic* y el locus *bind*. En el caso concreto de pMV158 dicha distancia es de 58 pb y en los miembros de la familia más próximos oscila entre 80 y 86 pb. Se ha observado que la replicación *in vivo* de pMV158 requiere la presencia de las DDRs, por lo que la conexión entre ambos loci del *dso* parece ser necesaria.

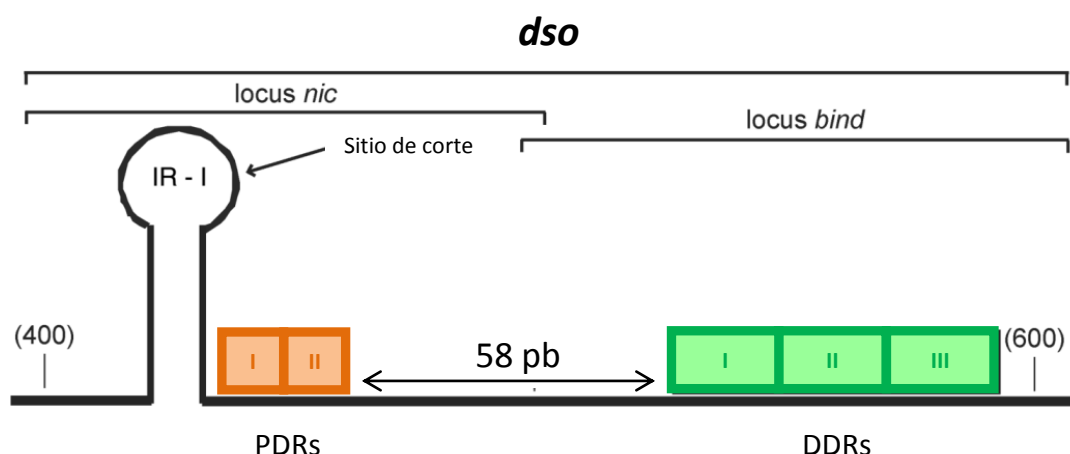


Figura 5. **Representación esquemática del *dso* de pMV158.** Se muestra el locus *bind*, constituido por las repeticiones directas distales (DDR), y el locus *nic*, compuesto por la repetición invertida que forma la horquilla en cuyo lazo se localiza el sitio de corte y las repeticiones directas proximales (PDR). Entre parentesis se indican las coordenadas de la secuencia del plásmido. Imagen modificada de (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007).

3.2. RepB, LA PROTEÍNA INICIADORA DE LA REPLICACIÓN DE pMV158

RepB es la proteína iniciadora de la replicación de pMV158. Se trata de la única endonucleasa HUH y la única Rep implicada en RCR en procariotas cuya estructura atómica ha sido resuelta para la proteína entera (Boer, Ruiz-Masó et al. 2009). Dicha estructura corresponde a la conformación hexamérica, que es en la que se obtiene la proteína tras su purificación a partir del sistema de expresión de *E. coli* según el método descrito en el apartado 25 de Métodos. En cuanto al estado de oligomerización de RepB en células de *Streptococcus pneumoniae* que contienen pMV158, se han observado diferentes homocomplejos que contienen desde 2 hasta 6 protómeros, siendo los predominantes RepB₁, RepB₂ y RepB₆ (Boer, Ruiz-Masó et al. 2009).

A continuación se describe la estructura de un único protómero (figura 6A) (Boer, Ruiz-Masó et al. 2009):

- Dominio N-terminal o de unión al origen (OBD). Es responsable de la actividad enzimática y de la unión al dsDNA específico del *dso*. Presenta una lámina β central, formada por 5 cadenas β antiparalelas, que se encuentra flanqueada a ambos lados por 4 hélices α . Sobre una de las caras de la lámina β se localiza el centro activo, compuesto por el residuo catalítico Y99 y un catión Mn^{2+} coordinado por los residuos H39, D42, H55 e H57, y el átomo de oxígeno de una molécula de agua.
- Dominio C-terminal o de oligomerización (OD). Está implicado en la hexamerización de la proteína. Consiste en 4 hélices α ; las hélices 5 y 8 son paralelas y la 6 y la 7 están interconectadas por una hélice 3_{10} .
- Entre ambos dominios se encuentra una pequeña región bisagra que otorga flexibilidad a la proteína.

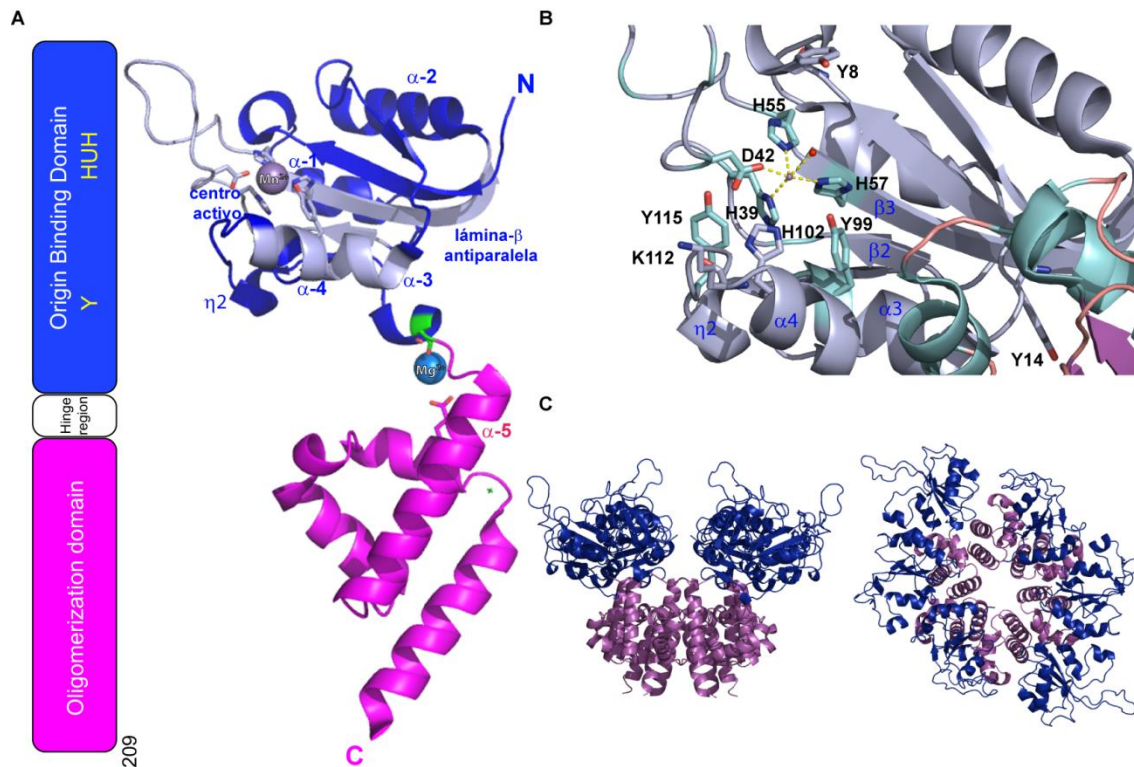


Figura 6. **Estructura tridimensional de RepB por cristalografía de rayos X.** (A) El protómero de RepB está constituido por dos dominios, el N-terminal o dominio endonucleasa (OBD) (azul), con la tirosina (Y) catalítica y motivo HuH de unión a metales, y el dominio C-terminal o dominio de hexamerización (OD) (magenta); ambos dominios están conectados por una región bisagra que otorga flexibilidad a la proteína. En la representación de la estructura del protómero de RepB se indica la localización del centro activo, del catión Mn^{2+} y de las hélices $\alpha 1$ a $\alpha 5$, y la hélice- 3_{10} $\eta 2$ que rodean a la lámina β antiparalela central. En la misma representación también se indica el catión Mg^{2+} situado en la región bisagra. (B) En este panel se muestra una vista ampliada del centro activo de RepB donde se indican los residuos involucrados en la unión del Mn^{2+} y que participan directa o indirectamente en el proceso catalítico. (C) Representación de la estructura C-2 del hexámero de RepB en dos orientaciones diferentes con los dominios OBD y OD coloreados en azul y magenta respectivamente.

En referencia a la conformación hexamérica, se han observado dos estructuras cristalinas diferentes de $RepB_6$ (Boer, Ruiz-Masó et al. 2009): i) la forma tetragonal (C3), en la que los OBDs se disponen como un trímero de dímeros, y ii) la forma trigonal (C2), donde los OBDs forman un dímero de trímeros (figura 7A). Al superponer las estructuras C3 y C2, únicamente tres OBDs muestran una posición similar en ambas estructuras, mientras que en lo referente a los dominios OD tanto C3 como C2 presentan el mismo anillo hexamérico; es decir, el anillo formado por los ODs presenta únicamente simetría senaria, mientras que los OBDs pueden mostrar simetría binaria o ternaria. Las dos simetrías en las que se pueden encontrar los OBDs surgen como consecuencia del pronunciado desplazamiento del dominio OBD cuando se comparan los diferentes protómeros. En términos geométricos, este desplazamiento se puede

describir por la rotación alrededor de un eje en un ángulo de aproximadamente 45° respecto a eje central del anillo hexamérico, lo que sitúa al OBD a varias distancias respecto al eje C6 central. Esto conduce a la aparición de un total de nueve orientaciones distintas del OBD respecto a los ODs en las dos estructuras cristalinas resueltas, tres para la forma C2 y seis para la forma C3. La plasticidad conformacional del hexámero de RepB, obtenida gracias a la combinación de un andamiaje rígido formado por el anillo hexamérico y dominios adicionales flexibles conectados por regiones bisagra, debe ser relevante para la correcta orientación de los OBDs involucrados tanto en el ensamblaje del complejo RepB-*dso* como en la actividad enzimática. Recientemente se ha determinado que no se establecen interacciones entre OBDs que fijen sus posiciones en cada una de las estructuras. En la estructura C2, cuya mayor resolución permite este análisis, la fijación de la orientación de los OBDs dependería de la formación de un puente salino formado entre R130 de la hélice 3₁₀ de la región bisagra y una zona cargada electronegativamente constituida por los residuos D135, E137, E138 y E141 de la hélice α 5 del OD del protómero adyacente (figura 7D). Otro elemento que podría contribuir en la orientación de los OBDs en C2 es la presencia de un ion metálico en la región bisagra, que se encontraría coordinado por átomos de oxígeno de los grupos carbonilos de la cadena principal de la hélice 3₁₀ de la región bisagra y por la cadena lateral del residuo E181 de la hélice α 7 del mismo protómero; también intervendría el residuo E137 de la hélice α 5 del OD de un protómero adyacente, que interaccionaría con el ion metálico a través de un puente de agua, en lugar de establecer un puente salino con R7 (figura 7D) (Boer, Ruiz-Masó et al. 2016).

En la forma hexamérica de RepB, tanto el surco entre los dos trímeros de OBDs de la estructura C2 como la superficie interior del anillo, definida por las hélices α 8, son de carácter electropositivo (figura 7B) y por ello son dos regiones potencialmente capaces de unir DNA, aunque el canal del anillo posee un diámetro de unos 15 Å y sólo podría albergar ssDNA. La reconstrucción mediante microscopía electrónica de las partículas de RepB₆ libre y RepB₆ unida al dsDNA del locus *bind* revela un incremento de densidad electrónica que ocluye el surco entre los dos trímeros de OBDs de RepB₆ en presencia de DNA (figura 7C), indicando que el reconocimiento del DNA específico del origen se produce mediante residuos localizados en esa región (Boer, Ruiz-Masó et al. 2009).

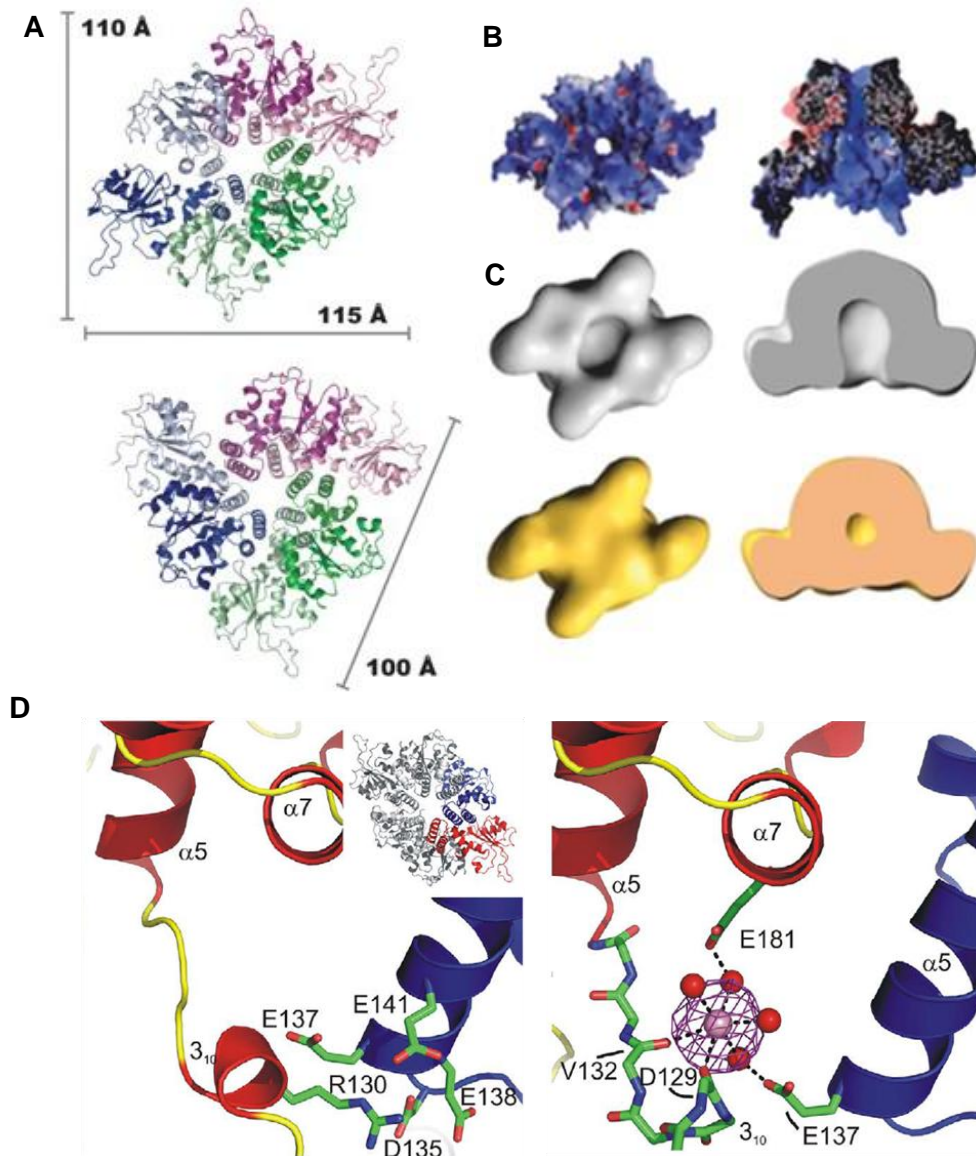


Figura 7. **Estructura tridimensional de RepB₆.** (A) En la parte superior se muestra la forma trigonal (C2) de RepB₆, en la que los OBDs están dispuestos como un dímero de trímeros, y en la parte inferior está la forma tetragonal (C3), donde los OBDs forman un trímero de dímeros. (B) Potencial electrostático de la superficie accesible al solvente en la estructura C2 vista desde los OBDs (izquierda) y en una sección de la estructura C3 (derecha). Azul, rojo y blanco representan potencial positivo, negativo y neutro, respectivamente. (C) Reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica de RepB₆ libre (gris) y RepB₆ unida a DNA (amarillo). El DNA ocluye el surco definido entre los dos trímeros de OBDs. (D) Visión parcial de la estructura de RepB₆ cocrystalizada con BaCl₂. Izquierda: se muestra la localización de los residuos involucrados en el puente salino que determina la orientación de los OBDs en la estructura C2; R130 de la hélice 3₁₀ de la región bisagra y los residuos D135, E137, E138 y E141 de la hélice α5 del OD del protómero adyacente. Derecha: se muestra la unión del ion metálico (Ba²⁺), que también podría participar en la orientación de los OBDs en la estructura C2. Dicho ion se encuentra coordinado por átomos de oxígeno de los grupos carbonilos de la cadena principal de la hélice 3₁₀ de la región bisagra y por la cadena lateral del residuo E181 de la hélice α7 del mismo protómero; también intervendría el residuo E137 de la hélice α5 del OD de un protómero adyacente.

Al igual que el resto de proteínas Rep, RepB es capaz de unirse específicamente al *dso* y presenta actividad endonucleolítica, requerida para cortar el ssDNA de la secuencia específica de corte tanto en el inicio como en la terminación de la replicación de la cadena líder. Asimismo posee actividad de transferencia de cadena, necesaria únicamente en la terminación. A continuación se describen una serie de observaciones e hipótesis, referentes a la actividad enzimática de RepB y a su capacidad de unión a DNA, que forman parte del contexto en el que se ha desarrollado el presente trabajo.

Respecto a la capacidad de unión al *dso*, se ha observado que RepB presenta mayor afinidad por el locus *bind* que por el locus *nic*. La diferente afinidad por ambas regiones del *dso* podría estar relacionada con la baja estabilidad del complejo RepB-*nic*, cuya vida media es menor de 1 min, en comparación con la estabilidad del complejo RepB-*bind*, que presenta una vida media de unos 20 min. Esta información, junto con los resultados de *footprinting* para la interacción entre RepB y DNA superenrollado (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007), apoyan la hipótesis por la cual la unión de RepB al sitio primario, el locus *bind*, favorece la interacción con el locus *nic*, lo que promueve la extrusión de la estructura cruciforme IR-I, adquiriendo así la secuencia de corte la conformación monocatenaria requerida para que tenga lugar el corte iniciador de la replicación plasmídica.

Respecto a las actividades endonucleolítica y de transferencia de cadena, parece imprescindible la formación de un aducto covalente entre RepB y la hebra parental cortada, ya que la generación de intermedios de ssDNA circular requiere necesariamente dicho aducto (Moscoso, del Solar et al. 1995). Adicionalmente, tal y como sucede en el caso de la proteína del gen A del fago ϕ X174, RepB podría presentar una segunda tirosina catalítica que le permitiera llevar a cabo el mecanismo *flip-flop* por el cual las reacciones de corte en la iniciación y en la terminación vienen dadas por dos residuos catalíticos diferentes. Debido a que no se han identificado candidatos a segunda tirosina catalítica en la estructura de RepB previamente a esta tesis, se estableció la hipótesis de que dos protómeros del hexámero de RepB estaban involucrados en la actividad enzimática y que la flexibilidad de los dominios OBD respecto al anillo de ODs posibilitaba el correcto posicionamiento de las tirosinas catalíticas de cada protómero.

4. LA HELICASA PcrA Y LA RCR

En el mecanismo RCR plasmídico la replicación de la hebra líder requiere de una helicasa que desenrolle el dsDNA en la horquilla de replicación; en bacterias Gram-positivas se trata de la helicasa PcrA, mientras que en Gram-negativas es UvrD. En este sentido, los trabajos realizados por Iordanescu en *Staphylococcus aureus* mostraron que un mutante en el gen *pcrA*, denominado *pcrA3*, presentaba una fuerte disminución del número de copias del plásmido pT181 y la acumulación de formas de DNA circulares abiertas, como consecuencia del corte mediado por la proteína iniciadora RepC en el origen de replicación plasmídico (Iordanescu 1993). La proteína PcrA purificada de estafilococo (PcrA_{Sau}) presenta actividad ATPasa, estimulada por la presencia de ssDNA, y posee actividad helicasa en las dos direcciones (3'→5' y 5'→3') (Anand and Khan 2004). Aunque la función precisa de PcrA_{Sau} no se conoce, la capacidad de la proteína para reconocer estructuras específicas del DNA puede ser clave para entender su función (Anand and Khan 2004). En concreto, su capacidad para reconocer estructuras presentes en el DNA del *dso* y su actividad helicasa bipolar son congruentes con el papel de PcrA en el desenrollamiento del DNA, que permitiría la progresión de la horquilla replicativa durante la replicación plasmídica RC (Koepsel, Murray et al. 1985, Dempsey, Birch et al. 1992, Jin, Rasooly et al. 1997, Jin and Novick 2001).

La interacción entre Rep y PcrA parece un aspecto clave en la replicación RC. Se ha observado que la interacción entre PcrA de *Bacillus stearothermophilus* y la proteína iniciadora RepD del plásmido pC221 aumenta la procesividad de la helicasa (Soultanas, Dillingham et al. 1999). Por otra parte, la interacción física entre PcrA_{Sau} y la proteína iniciadora de la replicación RepC, codificada por pT181, se ha postulado como esencial para la iniciación de la replicación RC del plásmido. PcrA_{Sau} es reclutada en el origen de replicación plasmídico a través de la interacción directa con la proteína iniciadora, RepC para pT181 y RepD para pC221, pudiendo así comenzar el desenrollamiento del DNA a partir del corte generado por Rep en el *dso*, que promueve la generación de una región de ssDNA en 5' (Soultanas, Dillingham et al. 1999, Chang, Naqvi et al. 2002). En el caso de RepD se ha observado que para que sea posible este reclutamiento de PcrA resulta imprescindible que la proteína Rep se encuentre unida covalentemente al grupo fosfato, por lo que la interacción entre Rep y PcrA debe suceder tras el corte en la secuencia específica del origen (Zhang, Dillingham et al. 2007). Para pC221 se ha determinado que la incorporación de PcrA es un proceso constituido por varios pasos. En primer lugar, la unión de RepD al *oriD*

provoca la remodelación de dicho origen incrementando la curvatura del DNA y favoreciendo la incorporación de PcrA. Una vez formado el complejo ternario RepD-*oriD*-PcrA la conformación del DNA se ve todavía más afectada, pudiéndose incluso formar un bucle alrededor del complejo. Finalmente, la unión de ATP a PcrA induce la remodelación del complejo ternario, tal vez permitiendo a PcrA iniciar el proceso de translocación (Machón, Lynch et al. 2010).

OBJETIVOS

La caracterización de las actividades enzimática y de unión a DNA de RepB, así como la relación de dichas características con los requerimientos del mecanismo de replicación por RC, pueden resultar de gran ayuda a la hora de ahondar en el conocimiento del mecanismo de replicación de pMV158, que es el objetivo final de este trabajo. Para abordarlo se plantearon los siguientes subobjetivos:

- 1. Análisis de la interacción de RepB con el *dso* plasmídico.** Caracterización de la unión de OBD y RepB a los dos loci del *dso* de pMV158. Determinación de los elementos estructurales y de los residuos aminoacídicos implicados.
- 2. Caracterización de la actividad enzimática de RepB.** Caracterización de las actividades de corte y de transferencia de cadena de OBD y RepB. Determinación de los residuos implicados en la actividad enzimática. Detección del aducto covalente formado entre la tirosina iniciadora y el extremo 5'-P de la cadena cortada. Implicaciones del catión Mn^{2+} en la estabilidad y en la actividad enzimática de RepB.
- 3. Estudio de la posible interacción entre RepB y PcrA de *S. pneumoniae*.** Análisis de la potencial interacción entre RepB y PcrA. Detección del hipotético complejo ternario RepB-PcrA-DNA.
- 4. Elaboración de un modelo para el proceso replicativo de pMV158.** Engranaje de los resultados obtenidos en un modelo para la replicación de pMV158.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. MATERIAL BIOLÓGICO: ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

1.1. ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas utilizadas en esta tesis, así como sus características genotípicas, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas

Estirpe bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	λ DE3 (<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>) $F^- dcm$ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁺) gal</i>	(Studier and Moffatt 1986)
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44</i> $\Delta(lac-proAB)$ <i>relA1</i> (F' <i>traD36 proAB⁺ lac^f ZΔM15</i>) λ^-	(Yanisch-Perron, Vieira et al. 1985)
<i>E. coli</i> M15	Estirpe derivada de <i>E. coli</i> K12 que contiene el plásmido pREP4, el cual confiere resistencia a Km y expresa constitutivamente el gen <i>lacI</i>	Quiagen
<i>S. pneumoniae</i> 708	<i>end-1 exo-1 trt-1 hex-4 malM594</i>	(Lacks and Greenberg 1977)

1.2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados y sus características más relevantes se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Tamaño (pb)	Marcador	Características	Referencia
pALT- <i>PstI</i> b-5	6.726	Tc ^R	Fragmento <i>PstI</i> menor de pLS1 clonado en <i>PstI</i> de pALTER-1 (orientación b), con delección de 5 pb entre los dos loci del <i>dso</i> .	Este trabajo
pALT- <i>PstI</i> b-10	6.721	Tc ^R	Fragmento <i>PstI</i> menor de pLS1 clonado en <i>PstI</i> de pALTER-1 (orientación b), con delección de 10 pb entre	Este trabajo

			los dos loci del <i>dso</i> .	
pALT- <i>Pst</i> Ib+5	6.736	Tc ^R	Fragmento <i>Pst</i> I menor de pLS1 clonado en <i>Pst</i> I de pALTER-1 (orientación b), con inserción de 5 pb entre los dos loci del <i>dso</i> .	Este trabajo
pALT- <i>Pst</i> Ib+9	6.740	Tc ^R	Fragmento <i>Pst</i> I menor de pLS1 clonado en <i>Pst</i> I de pALTER-1 (orientación b), con inserción de 9 pb entre los dos loci del <i>dso</i> .	Este trabajo
pMV158	5.541	Tc ^R	Plásmido natural de <i>S. agalactiae</i>	(Burdett 1980)
pQE1-OBD	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	(Boer, Ruiz-Masó et al. 2009)
pQE1-OBD _{D69A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{D69A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{R72A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{R72A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{K76A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{K76A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{R72A, K73A, K74A, K76A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{R72A, K73A, K74A, K76A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{E4A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{E4A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{K5A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{K5A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{K3A, E4A, K5A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{K3A, E4A, K5A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo

pQE1-OB _D _{Y8A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y8A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{Y14A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y14A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{D42A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{D42A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{Y99A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y99A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{H102A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{H102A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{K112A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{K112A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{Y115A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y115A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{Y14A, Y99A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y14A, Y99A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{D42A, Y115A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{D42A, Y115A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{Y99A, H102A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y99A, H102A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OB _D _{Y99H, H102Y}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OB _D _{Y99H, H102Y} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo

pQE1-OBD _{Y99A, Y115A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{Y99A, Y115A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-OBD _{H102A, K112A}	3.896	Amp ^R	Construcción utilizada para generar OBD _{H102A, K112A} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo
pQE1-pcrA	5.766	Amp ^R	Construcción utilizada para generar PcrAS _{pn} con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Este trabajo

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA *E. coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio TY (Maniatis 1982), suplementado, cuando fue necesario, con los antibióticos ampicilina (Ap) y kanamicina (Km) a unas concentraciones de 100-200 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Del mismo modo, el crecimiento en medio sólido se realizó en TY suplementado, cuando fue necesario, con los antibióticos y concentraciones indicadas anteriormente y además se añadió 1,5% de bacto-agar, responsable de la consistencia sólida del medio de cultivo. Para la puesta en competencia y transformación de las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio SOB (Hanahan 1983). En la transformación por electroporación se empleó el medio SOC (medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa) para la recuperación celular.

2.2. MEDIO DE CULTIVO PARA *S. pneumoniae*

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* en medio líquido se utilizó AGCH (Lacks 1966) suplementado con 0,3% de sacarosa y 0,2% de extracto de levadura. Cuando fue preciso se añadió 1 µg/ml de tetraciclina (Tc). Para el crecimiento en medio sólido, se mezclaron las células y el antibiótico correspondiente en una capa basal compuesta por AGCH, 0,3% de sacarosa, 0,2% de extracto de levadura y 1% de bacto-agar. Esta capa se cubrió con otra superficial, compuesta también por AGCH, pero con 0,75% de bacto-agar.

3. OLIGONUCLEÓTIDOS

En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos (oligos) empleados.

4. ENZIMAS

Las enzimas ligasa del fago T4, CpG Methyltransferase (M.SssI), polinucleótidoquinasa del fago T4 (T4PNK), así como las enzimas de restricción, se adquirieron de New England Biolabs. Las DNA polimerasas *Phusion*, *Taq* y *AccuPrime Pfx* fueron de Finnzymes, Roche (o Invitrogen) y Thermo Fisher Scientific, respectivamente.

5. PRODUCTOS QUÍMICOS, SOPORTES Y REACTIVOS

Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Pronadisa, Merck, Sigma, BD Biosciences y Difco. De Sigma se adquirieron: Tc, polietilenimina, permanganato potásico y la resina HIS-select. Roche suministró: Ap, IPTG, el inhibidor de proteasas *complete Mix* y los dNTPs no radiactivos. De Amersham: el shepadex G-50, las columnas Microspin G-25, el material para cromatografía y los nucleótidos radiactivos. Los siguientes productos: agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, β -mercaptoetanol (β -ME), SDS, tritón X-100, Commassie Bio-safe, resina de agarosa-heparina, membranas de PVDF, el kit Clarity Western ECL Substrate, y los marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* y *Precision Plus Protein Western C Standards*, fueron suministrados por Bio-Rad. Los tubos de plástico fueron de Eppendorf y BD Biosciences. Para la purificación de fragmentos de DNA de agarosa se utilizó el kit QIAquick y para la eliminación de la etiqueta His₆ el kit TAGZyme, ambos de Quiagen. Los dispositivos Vivaspin fueron de GE Healthcare, y los Nanosep de Pall Life Science. Se emplearon los sistemas GeneTailor y GENEART Site-Directed Mutagenesis System de Invitrogen para mutagénesis dirigida. Las preparaciones de DNA plasmídico se realizaron con el kit Midiprep de Genomed. El coprecipitante Pellet paint fue de Novagen. Para la tinción del DNA se empleó EtBr de Bio-Rad o GelRed de Biotium. En los ensayos de *Western blot*, el sistema *StrepTactin* fue de Bio-Rad y el anticuerpo secundario de Sigma. Los filtros de nitrocelulosa para el filtrado de soluciones fueron suministrados por Millipore. Las membranas para diálisis se obtuvieron de Spectrum, y las diapositivas de diálisis,

de Pierce. Para las autorradiografías se usaron películas X-Omat S de Agfa. Las pantallas amplificadoras empleadas fueron Cronex Ligthingplus de Dupont.

Tabla 3. Oligos utilizados.

Oligo	Tamaño (b/pb)	Secuencia	Uso
DDRC	19	5' - CTTTTCGGCGACTTTTCGG - 3' 3' - GAAAAGCCGCTGAAAAGCC - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
DDRCf	19	5' - [Cy5] CTTTTCGGCGACTTTTCGG - 3' 3' - GAAAAGCCGCTGAAAAGCC - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
DDRL	19	5' - AATC TCGGCGACTTTTCGG - 3' 3' - TTAG AGCCGCTGAAAAGCC - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
DDRLf	19	5' - [Cy5] AATC TCGGCGACTTTTCGG - 3' 3' - TTAG AGCCGCTGAAAAGCC - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
DDRR	19	5' - CTTTTCGGCGACTTTT TTAG - 3' 3' - GAAAAGCCGCTGAAA AATC - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
DDRRf	19	5' - [Cy5] CTTTTCGGCGACTTTT TTAG - 3' 3' - GAAAAGCCGCTGAAA AATC - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
1DDR	20	5' - AATC TCGGCGACTTT TTAGA - 3' 3' - TTAG AGCCGCTGAA AAATCT - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
1DDRf	20	5' - [Cy5] AATC TCGGCGACTTT TTAGA - 3' 3' - TTAG AGCCGCTGAA AAATCT - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
3DDRf	42	5' - AATC TCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTT TTAGA - 3' 5' - [Cy5] TTAG AGCCGCTGAAAAGCCGCTGAAAAGCCGCTGAAA AAATCT - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
1PDRf	17	5' - [Cy5] CTATAG TGCCGGA AATCA - 3' 3' - GATAT CACGGCT TTAGT - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
2PDR	22	5' - TATAG TGCCGAGTGCCAA AATC - 3' 3' - ATAT CACGGCTCACGGT TTAG - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
2PDRf	24	5' - [Cy5] CTATAG TGCCGAGTGCCAA AATCA - 3' 3' - GATAT CACGGCTCACGGT TTAGT - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
NOE	19	5' - CGGGTCGGTAATTGGGTTT - 3' 3' - GCCCAGCCATTAACCCAAA - 5'	Ensayos de interacción proteína-DNA

NNOEf	19	5' - [Cy5] CTAATCAGTCATTGGGTTT-3' 3' - GATTAGTCAGTAACCCAAA-5'	Ensayos de interacción proteína-DNA
IR-I.1	61	5' - GCATTAATAACGAGGTAAGGGCGGGCTACTACGACCCGCCCTGCATGTACATAATAACAGC-3'	Ensayos de interacción proteína-DNA
IR-I.2	61	5' - GCTGTTATTATGTACATGCACCCGCCAGCATCATCGGGCGGGTTACCTCGTTATTAATGC-3'	Ensayos de interacción proteína-DNA
1DDRb	19	5' - [Biotina] TTTTTTCTTTCGGCGACTTTTCGG-3' 3' - GAAAAGCCGCTGAAAAGCC-5'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
3DDRb	42	5' - [Biotina] TTTTTTAATCTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTGTAGA-3' 3' - TTAGAGCCGCTGAAAAGCCGCTGAAAAGCCGCTGAAAATCT-5'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
2PDRb	24	5' - [Biotina] TTTTTTCTATAGTGCCGAGTGCCAAATCA-3' 3' - GATATCACGGCTCACGGTTTGTAGT-5'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
NNOEb	19	5' - [Biotina] TTTTTTCTAATCAGTCATTGGGTTT-3' 3' - GATTAGTCAGTAACCCAAA-5'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
hIR-I.1mb	29	5' - [Biotina] TTTTTTGGGGGGCTACTACCACCCCCC-3'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
hIR-I.1	23	5' - GGGGGGGCTACTACCACCCCCC-3'	Complementario a los ensayos con hIR-I.1mb
fx23mb	29	5' - [Biotina] TTTTTTGCTTCCGTACTACCACCCCCA-3'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
fx23m	23	5' - TGCTTCCGTACTACCACCCCCA-3'	Ensayos de interacción proteína-DNA
DDRtailb	40 + 11	5' - TCAAAATCTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTCGGCGACTTT-3' 3' - AAACCTCCGAGCAGTTTAGAGCCGCTGAAAAGCCGCTGAAAAGCCGCTGAAATTTTTT [Biotina] -5'	Ensayos de interacción proteína-DNA (SPR)
ST12	12	5' - GGGGGCTACTACG-3'	Sustrato para actividad de transferencia de cadena en ensayos enzimáticos de RepB, OBD
fx23	23	5' - TGCTTCCGTACTACGACCCCCA-3'	Ensayos enzimáticos de RepB, OBD y sus formas mutantes
fx23f	23	5' - TGCTTCCGTACTACGACCCCCA [Cy5] -3'	Ensayos enzimáticos de RepB, OBD y sus formas mutantes

fx23+4f3'	27	5' -TGCTTCCG TACTACGACCCCC ATTAA [Cy5] -3'	Ensayos enzimáticos de RepB, OBD y sus formas mutantes
fx8+4f3'	12	5' - ACCCCC ATTAA [Cy5] -3'	Ensayos enzimáticos de RepB, OBD y sus formas mutantes
ST30	30	5' -TACTGCGGAATTCTGCTTCCATC TACTACG -3'	Sustrato para actividad de transferencia de cadena en ensayos enzimáticos de RepB, OBD
ST18	18	5' -CTGCTTCCATC TACTACG -3'	Sustrato para actividad de transferencia de cadena en ensayos enzimáticos de RepB, OBD
dis1	20	5' -CAGCTCTAAGGCTAAAGGCG-3'	Mutagénesis dirigida para modificar la distancia entre los locus <i>bind</i> y <i>nic</i>
dis-5pb	19	5' -GTTTGAGGCTCGTCAAATC-3'	Mutagénesis dirigida para modificar la distancia entre los locus <i>bind</i> y <i>nic</i>
dis-10pb	17	5' -AGGCTCGTCAAATCTCG-3'	Mutagénesis dirigida para modificar la distancia entre los locus <i>bind</i> y <i>nic</i>
dis+5pb	30	5' -TTTAGCCTTAGAGCTGGGATCCAAGGGTTT-3'	Mutagénesis dirigida para modificar la distancia entre los locus <i>bind</i> y <i>nic</i>
dis+10pb	40	5' -TTTAGCCTTAGAGCTGGGATCCAGCTAAGGGTTTGAGGCT-3'	Mutagénesis dirigida para modificar la distancia entre los locus <i>bind</i> y <i>nic</i>
M1DEL	33	5' -CACCATCACCATCACCAGGCTAAAGAAAAAGCA-3'	Delección de la M inicial de OBD
RHD	31	5' -CAATGGACTAATTGCCATCGGCACTCCAAGC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
D42AF	42	5' -CCGATGGCAATTAGTCCATTGCATGATAAGGCGAAGAGTAGT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Ralfa2	30	5' -TACACTATCTGCAGTAACTGGATTTTTCAGC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
R72AF	33	5' -CAGTTACTGCAGATAGTGTAGCGAAAAAGATTA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
K76AF	44	5' -CAGTTACTGCAGATAGTGTACGTAAAAAGATTGCGTTATTGCTT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD

R72K73K74K76AF	44	5' -CAGTTACTGCAGATAGTGTAGCGGCGGCGATTGCGTTATTGCTT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
E4AF	39	5' -CACCATCACCATCACCAGGCTAAAGCGAAAGCAAGATAC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
K5AF	42	5' -CACCATCACCATCACCAGGCTAAAGAAGCGGCAAGATACTTC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
K3E4K5AF	42	5' -CACCATCACCATCACCAGGCTGCGGCGGCGGCAAGATACTTC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
RKEKA	30	5' -CTGGTCATGGTGATGGTGATGTTTCATAGT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y99AgaF	36	5' -TCGAAAATATGTATTTGGCGTTAACGCACGAGAGCA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y99AgaR	36	5' -TGCTCTCGTGCGTTAACGCCAAATACATATTTTCGA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
H102AgaF	36	5' -TGTATTTGTATTTAACGGCGGAGAGCAAGGACGCTA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
H102AgaR	36	5' -TAGCGTCCTTGCTCTCCGCCGTTAAATACAAATACA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
D69AF	28	5' -AATCCAGTTACTGCAGCGAGTGACGTA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
D69AR	30	5' -TGCAGTAACTGGATTTTGTAGCTATATAAAG-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
K112AF	35	5' -AAGGACGCTATTGCTAAGAAGGCGCATGTTTATGA-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
K112AR	31	5' -CTTCTTAGCAATAGCGTCCTTGCTCTCGTGC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y115AF	42	5' -AAGGACGCTATTGCTAAGAAGAAACATGTTGCGGATAAGGCT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y99HH1O2YF	41	5' -ATGTCGAAAATATGTATTTGCATTTAACGTATGAGAGCAAG-3'	Mutagénesis dirigida de OBD

Y8AF	32	5' -AAAGAAAAAGCAAGAGCGTTCACCTTTTTTACT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y8AR	32	5' -AGTAAAAAAGTGAACGCTCTTGCTTTTTCTTT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y14AgaF	37	5' -ACTTCACTTTTTTACTTGCGCCTGAATCAATTCCAAG-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y14AgaR	37	5' -CTTGGAATTGATTTCAGGCGCAAGTAAAAAGTGAAGT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y99AH102AF	36	5' -AATATGTATTTGGCGTTAACGGCAGAGAGCAAGGAC-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Y99AH102AR	36	5' -GTCCTTGCTCTCTGCCGTTAACGCCAAATACATATT-3'	Mutagénesis dirigida de OBD
Top3tailCy5-Bot3taildu	18 + 20	3' -ACCGCTGCCGTCGCTCCG[Cy5]-5' 5' -TGGCGACGGCAGCGAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Ensayos de actividad helicasa de PcrA <i>Sau</i>

Con el código de colores se resaltan las repeticiones directas e indirectas del *dso*. Las secuencias de las DDRs se muestran en amarillo, rojo y marrón; las secuencias de las PDRs en morado y azul, y la secuencia de la IR-I en verde.

6. TAMPONES

Tabla 4. **Tampones**

Nombre	Composición	Aplicación
Tampón TBE	Tris base 89 mM Ácido bórico 89 mM EDTA 2,5 mM El pH resultante es 8,3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa y PAA
Tampón de carga SLB 5X	Tris-HCl 250 mM pH 8,8 SDS 5% EDTA 10 mM β -ME 25% Glicerol 50 % Azul de bromofenol 1 mg/ml	Electroforesis de proteínas en geles de PAA/SDS
Colorante de carga SBE 3X	Sacarosa 30% Azul de bromofenol 0,075% EDTA 2,5 mM	Electroforesis de DNA
Colorante de carga BXGE 10X	Azul de bromofenol 0,075% Xilencianol 0,25% Glicerol 60% EDTA 10 mM	Electroforesis de DNA
Tampón B	Tris-HCl 20 mM pH 8,1 DTT 5 mM	Ensayos de actividad de RepB
Tampón H	Tris-HCl 20 mM pH 8,1 EDTA 1 mM DTT 5 mM Etilenglicol 5%	Purificación de RepB. Se suplementa con NaCl a distintas concentraciones
Tampón TBS	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 NaCl 500 mM	Ensayos de <i>Western-blot</i>
Tampón TBST	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 NaCl 500 mM Tween-20 0,1%	Ensayos de <i>Western-blot</i>
Tampón Towbin	Tris-HCl 25 mM pH 8,3 Glicina 192 mM MetOH 20%	Ensayos de <i>Western-blot</i>
Tampón HEL	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 KCl 100 mM MgCl ₂ 3 mM ATP 3 mM DTT 5 mM Glicerol 10%	Ensayos de actividad helicasa para PcrA
Tampón LIS	Tris-HCl 50 mM pH 7,5 DTT 1 mM	Purificación de proteínas con la etiqueta His ₆

	Etilenglicol 5% NaCl 1 M Imidazol 20 mM	
Tampón ELU	Tris-HCl 50 mM pH 7,5 DTT 1 mM Etilenglicol 5% NaCl 1 M Imidazol 250 mM	Purificación de proteínas con la etiqueta His ₆
Tampón A	Tris-HCl 50 mM pH 7,5 DTT 1 mM Etilenglicol 5% NaCl 1 M EDTA 2 mM	Purificación de PcrA His ₆
Tampón TAGZyme	NaH ₂ PO ₄ 20mM pH7 NaCl 150mM	Eliminación de etiqueta His ₆
Tampón AN	Tris-HCl 10mM pH 8,0 EDTA 1 mM NaCl 100 mM	Anillamiento de oligos
Colorante de carga BXF 1X	Formamida desionizada 80% NaOH 10 mM Azul de bromofenol 0,1% Xilencianol 0,1% EDTA 1 mM	Tampón de carga para electroforesis de DNA en geles de PAA desnaturalizantes
Tampón E	Tris-HCl 20 mM pH 7,6 NaCl 200 mM EDTA 2 mM	Elución de fragmentos de DNA de geles de PAA
Tampón EO	Acetato amónico 500 mM pH 7,5 Acetato magnésico 10 mM SDS 0,1%	Elución de oligos de geles de PAA desnaturalizantes
Tampón TG	Tris-HCl 50 mM pH 8,3 Glicina 300 mM SDS 0,1% EDTA 2 mM	Electroforesis de proteínas en geles de PAA/SDS
Tampón cátodo	Tris-HCl 100 mM pH 8,25 Tricina 100 mM SDS 0,1%	Electroforesis de proteínas en geles de PAA/SDS (Tris-Tricina)
Tampón ánodo	Tris-HCl 200 mM pH 8,9	Electroforesis de proteínas en geles de PAA/SDS (Tris-Tricina)
Tampón TNE	Tris-HCl 10 mM pH 7,6 NaCl 300 mM EDTA 1 mM	Ensayos de SPR
Tampón HBS – EP	HEPES–NaOH 10 mM pH 7,5 NaCl 150 mM	Ensayos de SPR

EDTA 3 mM

Surfactante P20 0,005%

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES DE *E. coli*

El crecimiento de *E. coli* en medio líquido se llevó a cabo a 37 °C, con fuerte agitación y aireación constante, empleando para ello matraces de un volumen 5 veces superior al del cultivo. El crecimiento se siguió por turbidimetría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm con el espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20D+ (LabX). Todas las estirpes se conservaron a -80 °C; previamente se añadió un 10% de glicerol y se incubó durante 10 min a 37 °C, seguidos de otros 10 min a 4 °C.

2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células de *E. coli* M15 fueron suministradas por Quiagen, y su preparación y transformación por electroporación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Dower (Dower, Miller et al. 1988). Se utilizó el electroporador Gene pulser (Bio-Rad), con las siguientes condiciones para la electroporación: 25 μ F, 2,5 kV/cm y 200 Ω .

Las células competentes de *S. pneumoniae* 708 se prepararon siguiendo el método descrito por Lacks (Lacks 1966). La transformación es una capacidad innata en estas células, por lo que la electroporación fue innecesaria.

3. PREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para las preparaciones de plásmido a partir de cultivos de *E. coli* se empleó un kit de minipreparaciones de DNA plasmídico (Favorgen) o un kit de midipreparaciones de DNA plasmídico (Genomed).

En el caso de *S. pneumoniae* se usó el método de extracción alcalina descrito por Birboim (Birboim and Doly 1979), incluyendo las modificaciones descritas por Stassi (Stassi, López et al. 1981).

4. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos de DNA empleados en esta tesis se obtuvieron mediante digestión con enzimas de restricción, hibridación de oligos o por PCR.

Las digestiones enzimáticas del DNA se realizaron bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. La inactivación de las enzimas se realizó por desnaturalización térmica cuando ésta fue posible, o mediante fenolización en caso contrario.

Se recurrió a extensión por termociclador cuando se pretendió la mutagénesis dirigida del fragmento de interés; para ello se emplearon los sistemas GeneTailor y GENEART Site-Directed Mutagenesis System, que requirieron las DNA polimerasas *Phusion* y *AccuPrime Pfx*, respectivamente.

En caso de tratarse de PCR inversa se siguió el método descrito por Ochman (Ochman, Gerber et al. 1988) y se empleó la DNA polimerasa *Phusion*.

Todas las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador MJ Mini (Bio-Rad) y las condiciones variaron en función del kit y de la enzima polimerasa empleada.

Para la hibridación de los oligos se añadió 25 μM de cada cadena complementaria a 40 μl de tampón AN. La mezcla se calentó a 10 $^{\circ}\text{C}$ por encima de su temperatura de fusión (Thanassi, Hartman-Neumann et al.) y se dejó enfriar lentamente hasta 26 $^{\circ}\text{C}$.

Las condiciones de hibridación cuando una de las cadenas estaba marcada con el fluoróforo Cy5 en 5' fueron modificadas para que la práctica totalidad de la cadena fluorescente quedara hibridada; para ello se favoreció la interacción intercatenaria aumentando la concentración de NaCl hasta 150 mM y se añadió un exceso de 10 veces del oligo no fluorescente respecto al fluorescente. La concentración resultante de oligo bicatenario fue 1,15 μM . El tratamiento de la mezcla de hibridación se llevó a cabo del mismo modo que para el caso de oligos no marcados.

5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE dsDNA Y OLIGOS MONOCATENARIOS

Los fragmentos de DNA bicatenario se purificaron con el kit de extracción de gel QIAquick (Quiagen).

La purificación de oligos monocatenarios se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de secuencia con un porcentaje de PAA adecuado a las dimensiones del oligo (12–20 %) y 8 M de urea. Las dimensiones del gel fueron: 36 cm de ancho, 40 cm de largo y 0,35 mm de espesor. El tratamiento de las muestras consistió en la adición de un volumen igual de formamida, el subsiguiente calentamiento durante 5 min a 95 °C y el rápido enfriamiento en hielo. Como colorante de carga se empleó BXF. La electroforesis tuvo lugar en tampón de carrera TBE a un voltaje constante de 1900-2000 V. Las bandas de DNA se visualizaron utilizando placas TLC fluorescentes de gel de sílice y una lámpara de UV. Tras recortarlas y fragmentarlas, se eluyó el DNA mediante incubación en tampón EO con agitación durante toda la noche a 37 °C. Seguidamente, los fragmentos de acrilamida se eliminaron de la mezcla mediante centrifugación en una columna spin-x (Costar) durante 10 min a 14.000 xg. El filtrado obtenido fue concentrado en un Nanosep 3K (Pall Life Sciences) a 5.000 xg y a continuación se realizaron dos ciclos de concentración/dilución con agua Milli-Q en este mismo dispositivo. Finalmente, se retiró la muestra retenida y se lavó la membrana con 20 µl de agua.

6. CUANTIFICACIÓN DE OLIGOS

La concentración y pureza de las muestras de DNA se determinó midiendo el espectro de absorbancia de las soluciones entre las longitudes de onda de 220 y 350 nm con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, y el grado de pureza se calculó por la relación entre las absorbancias medidas a 260 y 280 nm y también por la relación entre 260 y 230 nm.

Cuando se realizaron ensayos en los que se evaluó una determinada característica de una serie de oligos primó la coherencia entre las concentraciones de los oligos antes que la exactitud de las concentraciones. En estos casos, tras determinar la concentración de los oligos con el espectrofotómetro, se analizaron simultáneamente por electroforesis en geles de agarosa o PAA para corregir las

concentraciones en función de las densidades de banda observadas en el gel. Como referencia se empleó un DNA de concentración bien definida y, puesto que se utilizó GelRed para la tinción, se realizó el ajuste pertinente en función de la diferencia de longitud con respecto al DNA de referencia.

7. SECUENCIACIÓN

La comprobación de la secuencia de los diferentes DNAs obtenidos durante el desarrollo de esta tesis fue realizada por Servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB (Secugen).

8. LIGACIÓN DE DNA

Las condiciones de reacción fueron las recomendadas por la casa suministradora de la enzima, incubándose las mezclas con 20 U de ligasa del fago T4 durante 12 h a 10-14 °C. Si posteriormente se pretendía electroporar *E. coli*, fue necesario inactivar la enzima calentando durante 10 min a 65 °C y precipitar con *n*-butanol el DNA, que a continuación se disolvió en un pequeño volumen (generalmente 5 µl) de agua Milli-Q estéril. Si, por el contrario, el DNA se iba a utilizar para transformar *S. pneumoniae*, no fue necesaria ni la inactivación enzimática ni la precipitación del DNA.

9. ELECTROFORESIS DE DNA

9.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para la electroforesis del DNA en geles de agarosa se utilizaron geles horizontales con una concentración de agarosa variable entre 0,8 y 1,5%, dependiendo del tamaño del DNA a analizar. Para la aplicación en el gel, las muestras se disolvieron en los tampones de carga BXGE o SBE. La electroforesis se realizó en los tampones TAE o TBE, a voltaje constante y a temperatura ambiente. Condiciones tales como la duración de la electroforesis, el voltaje aplicado o la longitud del gel, dependieron de las características del DNA a analizar. La tinción del DNA se realizó o bien con GelRed, o con 0,5-1 µg/ml de BrEt, en ambos casos durante 30 min a temperatura ambiente. En determinadas ocasiones fue necesaria la tinción del DNA durante la electroforesis; para ello el BrEt se incluyó tanto en el gel como en el tampón

de electroforesis. El DNA se visualizó con el sistema de documentación de geles GelDocXR (Bio-Rad).

9.2. ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE PAA

La electroforesis de DNA en geles nativos de PAA se realizó en geles verticales y tampón TBE. La concentración de PAA varió entre un 5 y un 10%, dependiendo de las características de los DNAs a analizar, y se utilizaron PSA y TEMED como catalizadores de la polimerización. Se emplearon geles de dos tamaños: las dimensiones de los grandes fueron 14,5 cm de ancho, 12 cm de largo y 1,5 mm de espesor, y las de los geles pequeños 8,4 cm de ancho, 7,2 cm de largo y 0,75 mm de espesor. Los geles pequeños se prepararon usando el sistema Mini Protean-II (Bio-Rad). En todos los casos los geles se sometieron a pre-electroforesis durante al menos 30 min. Usualmente se aplicó un voltaje de 10 V/cm, aunque se aumentó a 15 V/cm en determinadas ocasiones. Antes de ser aplicadas en el gel, las muestras se disolvieron en tampón de carga BXGE. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron del mismo modo que los de agarosa, salvo cuando se empleó DNA marcado fluorescentemente, en cuyo caso la detección se realizó mediante el sistema Phosphorimager FLA-3000 (Fujifilm).

9.3. GELES DE SECUENCIACIÓN

Se emplearon geles de PAA al 8%, con 7 M de urea, en tampón TBE, y se usaron PSA y TEMED como catalizadores de la polimerización. Las dimensiones de los geles fueron: 36 cm de ancho, 40 cm de largo y 0,35 mm de espesor. Las muestras se disolvieron en tampón de carga BXF, se desnaturalizaron por calor durante 5 min a 85 °C y se enfriaron seguidamente en una mezcla de agua y hielo. Los geles fueron sometidos a pre-electroforesis durante al menos 1 h a 1.800 V. Para mantener una temperatura de 55 °C, la electroforesis se llevó a cabo a un vataje constante de 55 W. Generalmente se utilizó DNA marcado radiactivamente, que se visualizó por exposición autorradiográfica o mediante el sistema Phosphorimager.

10. FOSFORILACIÓN EN 5' DE UN OLIGO

La reacción se realizó para 300 pmol de oligo en un volumen final de 50 µl, constituido por el tampón de la enzima, 1 mM de ATP y 10 U de enzima T4PNK. La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 37 °C, y a continuación, para inactivar

la enzima, se sometió durante 20 min a 65 °C. Finalmente, la eliminación del nucleótido no incorporado se llevó a cabo con columnas G-25 siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

11. MARCAJE RADIATIVO DE OLIGOS EN 5'

El marcaje radiactivo de oligos en 5' se realizó siguiendo el método descrito en (Sambrook, Fritsch et al. 1989) y las indicaciones de New England Biolabs sobre las condiciones de uso de la enzima T4PNK. Como isótopo radiactivo se empleó [γ - 32 P] ATP con una actividad específica de 3.000 Ci/mmol. La mezcla de reacción contenía 30-60 pmol de oligo, 10 U de enzima y 80 pmol de [γ - 32 P] ATP; la incubación se realizó durante 30 min a 37 °C. A continuación, el nucleótido radiactivo no incorporado se eliminó por cromatografía de filtración empleando columnas G-25.

12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL DOMINIO OBD DE RepB

Los mutantes del dominio OBD de RepB se obtuvieron por mutagénesis dirigida mediante los sistemas GeneTailor y GENEART. Cada mutación fue incluida en el vector pQE1-OBD, previamente metilado, mediante extensión en termociclador a partir de oligos que presentaban dicha mutación en sus secuencias. Para el sistema GeneTailor, únicamente uno de los dos oligos fue mutagénico, mientras que en el caso de GENEART ambos lo fueron.

A continuación, la estirpe M15 de *E. coli* se transformó por electroporación con los productos de la mutagénesis. Debido a que el DNA molde pQE1-OBD fue metilado por la CpG metiltransferasa de los kits, el sistema de restricción *Mcr*BC dependiente de metilación de *E. coli* fue capaz de degradarlo, reportando una mayor frecuencia de bacterias portadoras de pQE1-OBD mutado. La recuperación celular se favoreció al incubar en medio SOC durante 1 h a 37 °C. Para confirmar la presencia de las mutaciones se recurrió a Secugen.

13. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para la electroforesis de proteínas se utilizaron geles discontinuos desnaturizantes de PAA (SDS-PAGE). El gel concentrador se preparó con PAA al 5% en 0,375 M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,1% de SDS. El gel separador se preparó con

PAA al 12% en 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8 y 0,1% de SDS. En ambos casos se usaron PSA y TEMED como catalizadores de la polimerización. Los geles se montaron en cubetas Mini-Protean (Bio-Rad). Antes de la aplicación, las muestras se disolvieron en tampón de carga SLB y se calentaron durante 3 min a 95 °C. Para la electroforesis se empleó tampón TG; inicialmente se aplicó un voltaje constante de 80 V y cuando las muestras atravesaron el gel concentrador se aumentó hasta 180 V. La tinción se realizó con una solución comercial de Azul de Coomassie Bio-safe (Bio-Rad).

Cuando se quiso diferenciar proteínas de tamaño reducido, menor a 10 kDa, se llevaron a cabo electroforesis con geles con tricina. El gel concentrador se preparó con PAA al 4% en 1 M de Tris-HCl pH 8,45 y 0,1% de SDS. El gel separador se preparó con PAA al 12% en 1 M de Tris-HCl pH 8,45, 0,1% de SDS y glicerol al 28%. Se usaron PSA y TEMED como catalizadores de la polimerización. Se emplearon dos tampones diferentes para la electroforesis, tampón cátodo y tampón ánodo (tabla 4). Las condiciones de electroforesis fueron las descritas en el párrafo anterior.

14. SOBREPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OBD-His₆

Se prepararon dos litros de cultivo de la estirpe *E. coli* M15[pREP4] conteniendo el vector pQE1-OBD en medio TY suplementado con 100 µg/ml de Ap y 25 µg/ml de Km. Cuando el cultivo, incubado a 37 °C con fuerte agitación, alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,5 se indujo la expresión de la región 5' del gen *repB* adicionando 1 mM de IPTG y se continuó la incubación en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 2 h adicionales. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con tampón H suplementado con 50 mM de NaCl. A continuación se resuspendieron en tampón LIS y se congelaron y descongelaron rápidamente para optimizar su lisis, que se llevó a cabo pasando la suspensión celular dos veces por una prensa French a una presión de 8,3 MPa. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10.600 xg durante 30 min a 4 °C. Para purificar OBD-His₆ se empleó una cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). El sobrenadante de la lisis celular se aplicó, a un flujo de 30 ml/h, a una columna HisTrap HP (GE Healthcare) de 5 ml de lecho y equilibrada en el mismo tampón. Después de aplicar la muestra se realizó un lavado de 20 volúmenes de columna con el tampón LIS. Seguidamente, la proteína fusionada a la etiqueta de His fue eluida con 16 volúmenes de columna de tampón ELU. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y aquellas que contuvieron OBD se juntaron y dializaron frente a tampón H

suplementado con 1 M de NaCl. La solución de OBD-His₆ fue concentrada por filtración mediante un dispositivo Vivaspín, que contiene un filtro con un tamaño promedio de poro de 3 kDa, hasta que la concentración de proteína fue de aproximadamente 5 mg/ml.

La concentración de OBD purificada se determinó generalmente con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, midiendo la absorbancia a 280 nm. Para determinar la presencia de ácidos nucleicos contaminantes se calculó la relación de absorbancia a 280 y 260 nm.

La concentración de OBD también se analizó mediante Qubit 2.0, midiendo la señal emitida cuando colorantes fluorescentes se unen a su molécula diana, en este caso proteína.

Adicionalmente se determinó el porcentaje de proteína activa (véase el apartado 18).

La sobreproducción y purificación de las formas mutantes de OBD-His₆ se realizó del mismo modo.

15. ELIMINACIÓN DE LA ETIQUETA His₆ N-TERMINAL DE OBD-His₆

La etiqueta His₆ N-terminal facilita en gran medida la purificación de proteínas, pero tras la purificación es conveniente eliminarla y comprobar que la actividad proteica permanece inalterada.

En las proteínas objeto de nuestro estudio, la etiqueta His₆ N-terminal se eliminó con el kit TAGZyme partiendo de una solución proteica de 0,3-5 mg/ml en tampón TAGZyme sin imidazol. Ya que las proteínas se encontraban en tampón H tras el proceso de purificación, fue necesario realizar varios ciclos de concentración/dilución mediante diafiltración en Nanosep 3K hasta reducir el tampón H a menos del 5%.

Para digerir la etiqueta His₆ se incubaron 0,1 U de DAPasa con 10 µl de Cisteamina-HCl 20 mM durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 6 U de Qciclase y la mezcla de enzimas se adicionó a la solución de proteína. Tras 30 min de

incubación a 37 °C, la mezcla se pasó por una columna de IMAC convenientemente equilibrada y se lavó con tampón TAGZyme suplementado con 20 mM de imidazol. De este modo, las enzimas del kit (que presentan una etiqueta de His en el extremo C-terminal) quedaron retenidas en la columna, mientras la proteína de interés eluyó en un volumen de 2 ml. Empleando un dispositivo Nanosep se reemplazó el tampón TAGZyme con imidazol por tampón TAGZyme sin imidazol y se concentró la solución hasta alcanzar un volumen de 100 µl. Para eliminar el piroglutamato generado por la Q ciclasa, 1 U de pGAPasa, incubada durante 10 min a 37 °C con 4 µl de Cisteamina-HCl 20 mM, se añadió a la solución de proteína. Esta mezcla se incubó durante 90 min a 37 °C y a continuación fue sometida a IMAC para eliminar la pGAPasa tal y como se describe en el paso anterior. De nuevo se cambió el tampón y se concentró la solución hasta 100 µl. La correcta eliminación de la etiqueta His₆ se verificó mediante electroforesis desnaturizante con Tris-tricina.

Con el fin de comprobar si efectivamente se eliminaba el piroglutámico, se realizó una segunda digestión con DAPasa. Para ello se incubaron durante 5 min a 22 °C 0,025 U de DAPasa y 5 µl de Cisteamina-HCl 2 mM, se añadieron 0,15 U de Q ciclasa y la mezcla de enzimas resultante se añadió a una alícuota de 10 µl de proteína OBD totalmente tratada. Tras una incubación de 30 min a 37 °C la muestra se analizó mediante SDS-PAGE, observándose la degradación de la proteína desprotegida por la eliminación del piroglutámico.

La eliminación de la etiqueta His₆ de las formas mutantes del OBD se realizó del mismo modo.

16. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración proteica de RepB₆, PcrA, OBD y sus mutantes fue determinada ocasionalmente mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000, midiendo la absorbancia a 280 nm. Sin embargo, por lo general se empleó el fluorímetro Qubit 2.0.

Para un valor de concentración más exacto se recurrió al análisis de aminoácidos, llevado a cabo por el Servicio de Química de Proteínas del CIB, que consistió en hidrolizar la proteína y determinar cuantitativamente la composición aminoacídica con el analizador Biochrom 30+.

Otro modo de determinar la concentración de una solución de proteína fue compararla con una muestra de concentración conocida de la misma proteína o equivalente. Para ello, 600 ng de cada una se sometieron a electroforesis simultáneamente. Esta estrategia fue la que se empleó siempre que en los experimentos subsiguientes se pretendiera comparar propiedades de varias proteínas.

17. ENSAYO DE CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

Se trata de una técnica que nos proporciona información sobre interacciones proteína-ácido nucleico (DNA o RNA). Se basa en el hecho de que la migración de una molécula de ácido nucleico sometida a electroforesis se ve modificada cuando esta molécula está unida a una o varias proteínas. Así, un fragmento de ácido nucleico asociado a una proteína migra a una velocidad menor a la que lo haría en ausencia de dicha proteína.

En nuestro caso estudiamos la interacción de las proteínas OBD (silvestre y mutantes), RepB₆ y PcrAS_{pn} con fragmentos de DNA que contienen diferentes regiones del *dso* de pMV158.

Tras la incubación de la mezcla de reacción, durante la cual se producen las interacciones intermoleculares correspondientes, se añadió tampón BXGE y se procedió a cargar la muestra en el gel. Para la electroforesis se emplearon geles nativos de 5-8% de PAA, con el fin de afectar lo menos posible a las interacciones sometidas a estudio, tampón de carrera TBE, y un voltaje de 10 V/cm. Las bandas de DNA o del complejo proteína-DNA se visualizaron mediante tinción con GelRed, y las imágenes se adquirieron con el sistema de documentación de geles GelDocXR. En caso de tratarse de DNA fluorescente, la visualización no requirió de tinción, y para evitar interferencias con la detección de fluorescencia se empleó tampón de carga sin azul de bromofenol ni xilencianol. Las imágenes se adquirieron gracias al sistema Phosphorimager FLA-3000 (Fujifilm).

18. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MOLÉCULAS DE OBD Y RepB₆ ACTIVAS

Ya que la proteína activa presenta capacidad de unión a DNA y que la pérdida de esta actividad sucede simultáneamente a la pérdida de la capacidad de unión a DNA, hemos considerado que las moléculas de proteína activa eran aquellas capaces de unirse al DNA. Para determinar el porcentaje de moléculas activas se emplearon condiciones de exceso de oligo respecto a proteína, garantizando suficiente oligo disponible para la interacción de todas las moléculas de proteína activa. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 5 µl de tampón B suplementado con 140 mM de NaCl. En las reacciones de unión se utilizó una concentración final del oligo DDRDL de 4 µM. Para visualizar los complejos OBD-DNA el oligo DDRDL se mezcló con una décima parte del oligo fluorescente de igual secuencia, DDRDLf. Los complejos se formaron al mezclar proteína OBD purificada, a concentraciones de 0,95 y 1,9 µM, con los oligos DDRDL y DDRDLf. Esta mezcla de unión se incubó durante 20 min a 22 °C y a continuación se le añadió tampón de carga. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 8%, previamente sometido a pre-electroforesis. Los complejos OBD-DNA se detectaron gracias a la fluorescencia emitida por el oligo DDRDLf cuando los geles se analizaron mediante el equipo FLA-3000. Para este oligo, como para todos los que portan el fluoróforo Cy5, se empleó una longitud de onda de excitación de 633 nm y un filtro para la emisión de 675 nm. De la determinación de la cantidad DNA unido a OBD se dedujo el porcentaje de moléculas de OBD unidas a DNA, que son las que se consideraron activas.

Para determinar el porcentaje de moléculas de RepB₆ activas se empleó el mismo procedimiento pero con 0,3, 0,4 y 0,6 µM del oligo fluorescente 3DDRf, oligo no fluorescente 3DDR hasta alcanzar 4 µM de oligo total y una concentración de RepB₆ de 0,07 µM. En este caso se emplearon geles nativos de PAA al 6%.

19. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE OBD Y SUS FORMAS MUTANTES AL DNA DEL LOCUS *bind* MEDIANTE EMSA

La interacción de OBD y sus formas mutantes con oligos de dsDNA que poseen fragmentos de secuencia del locus *bind* se analizó mediante EMSA. En general las reacciones de unión se llevaron a cabo en un volumen de 5 µl. Cada muestra se preparó mezclando los siguientes componentes: 3 µl de tampón B

suplementado con el oligo sometido a estudio y NaCl, de modo que la concentración final de sales fue 300 mM; el volumen de tampón TAGZyme necesario para alcanzar los 5 µl finales, y cantidades crecientes de proteína. Tras añadir la proteína, las muestras se incubaron durante 20 min a 22 °C y se mezclaron con el tampón de carga BXGE. Seguidamente fueron aplicadas en geles nativos de PAA al 8% (pre-electroforesis de 30 min a 10 V/cm) y sometidas a electroforesis a 10 V/cm.

Mayoritariamente se emplearon oligos marcados con el fluoróforo Cy5 a una concentración de 20 nM y la detección se realizó mediante el sistema Phosphorimager FLA-3000, bajo las mismas condiciones que se describen en el apartado anterior. Cuando se emplearon oligos no marcados, su concentración fue 0,5 µM y el DNA se tiñó con GelRed para su visualización con el sistema de documentación de geles GelDocXR.

En el caso de RepB₆ no se consiguió determinar la K_d mediante EMSA. Los ensayos se realizaron del mismo modo que para OBD y sus formas mutantes con las siguientes salvedades: se empleó un rango de concentración proteica de 0,6-23,5 µM, y para que el complejo formado por la proteína hexamérica y el DNA fuera capaz de migrar a través del gel se utilizaron geles de PAA al 6%.

Los datos obtenidos en estos ensayos fueron analizados estadísticamente con la ayuda del programa SigmaPlot. Se realizó un ajuste no lineal a un modelo representativo de la unión de un ligando a un único sitio de unión.

20. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS OBD-DDR

La determinación de la vida media del complejo OBD-DDRC se llevó a cabo mediante ensayos de cinética de disociación en los que, tras incubar una mezcla de proteína y oligo fluorescente el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de asociación/disociación, se añadió un exceso de un oligo de igual secuencia pero sin marcaje fluorescente para visualizar la disociación del complejo.

Se utilizaron las condiciones y metodología descritas en el apartado 19. El volumen de reacción fue escalado en función del número de muestras a analizar, siendo el volumen de cada una igual al de una muestra ordinaria de EMSA, es decir 5 µl. Del mismo modo, se empleó el oligo fluorescente DDRCf a una concentración de

20 nM, aunque en este caso, tras la incubación de 20 min a 22 °C que sucede a la adición de la proteína, se añadió un exceso (20 µM) del oligo no fluorescente de igual secuencia (DDRC) para disociar irreversiblemente el complejo RepB-DNA marcado, momento en el cual se comenzó a medir el transcurso del tiempo. A partir de entonces se tomaron muestras en los intervalos indicados.

La ecuación empleada para el análisis de datos fue la siguiente:

$$\ln \frac{[C1]}{[C1]_0} = -k_d t$$

[C1] es la concentración de complejo OBD-DDRC en el tiempo t y $[C1]_0$ su valor en el momento $t = 0$.

De la anterior ecuación se deduce que la vida media, $t_{1/2}$, viene dada por $\ln 2/k_d$.

21. ANÁLISIS DE LA COOPERATIVIDAD EN LA UNIÓN DE RepB A DNA

Para estudiar el potencial efecto cooperativo de los sucesivos eventos de unión de OBD al fragmento de DNA que posee las tres DDRs se empleó el procedimiento descrito por Senear y Brenowitz (Senear and Brenowitz 1991). Se realizaron varios EMSAs con 20 o 40 nM de 3DDRf y concentraciones de OBD en el rango 0,2-1,3 µM. Se observaron tres complejos, C1, C2 y C3, correspondientes al DNA con 1, 2 o 3 sitios ocupados por OBD. La cuantificación de las bandas nos reportó las fracciones de DNA con 0, 1, 2 y 3 sitios ocupados.

La tabla 5 muestra el modelo para un sistema compuesto por un DNA con tres sitios de unión y un solo ligando. La probabilidad relativa de cada una de las configuraciones viene dada por la siguiente fórmula:

$$f_s = \frac{e^{-\frac{\Delta G_s}{RT}} L^j}{\sum_{s,j} e^{-\frac{\Delta G_s}{RT}} L^j}$$

ΔG_s es la suma de las contribuciones de energía libre para la configuración s (tabla 5), R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, L es la concentración de proteína libre y j es el número de ligandos unidos en la configuración s .

Las ecuaciones para θ_i , es decir, la fracción de moléculas de DNA con i ligandos unidos, se obtienen de sumar las probabilidades relativas de las configuraciones apropiadas. Para un sistema de tres sitios (tabla 5):

$$\theta_0 = f_1$$

$$\theta_1 = f_2 + f_3 + f_4$$

$$\theta_2 = f_5 + f_6 + f_7$$

$$\theta_3 = f_8 + f_9 + f_{10}$$

Estas ecuaciones se simplifican al sustituir $k = e^{-\Delta G/RT}$, obteniendo:

$$\theta_0 = \frac{1}{Z}$$

$$\theta_1 = \frac{(k_1 + k_2 + k_3)L}{Z} = \frac{K_1 L}{Z}$$

$$\theta_2 = \frac{(k_1 k_2 k_{12} + k_1 k_3 k_{13} + k_2 k_3 k_{23})L^2}{Z} = \frac{K_2 L^2}{Z}$$

$$\theta_3 = \frac{(k_1 k_2 k_3 (k_{12} + k_{13} + k_{23}))L^3}{Z} = \frac{K_3 L^3}{Z}$$

$$\text{donde } Z = 1 + K_1 L + K_2 L^2 + K_3 L^3$$

Las interacciones cooperativas se pueden inferir de la comparación de las constantes macroscópicas del equilibrio. En un sistema de tres sitios, el segundo y tercer evento de unión son cooperativos si $K_2 > K_1^2/3$, y si $K_3 > K_2 K_1/3$, respectivamente.

Tabla 5. **Modelo de cooperatividad**

Tres sitios (caso específico)				
Especie	Configuraciones de unión			Contribuciones de energía libre
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	
1				Estado de referencia
2	L			ΔG_1
3		L		ΔG_2
4			L	ΔG_3
5	L \longleftrightarrow L			$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_{12}$
6		L \longleftrightarrow L		$\Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{23}$
7	L \longleftrightarrow L			$\Delta G_1 + \Delta G_3 + \Delta G_{13}$
8	L \longleftrightarrow L		L	$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{12}$
9	L	L \longleftrightarrow L		$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{23}$
10	L \longleftrightarrow L		L	$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{13}$
				ΔG_{s1}
				ΔG_{s2}
				ΔG_{s3}
				ΔG_{s4}
				ΔG_{s5}
				ΔG_{s6}
				ΔG_{s7}
				ΔG_{s8}
				ΔG_{s9}
				ΔG_{s10}

22. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE RepB, OBD Y SUS FORMAS MUTANTES SOBRE OLIGOS NO FLUORESCENTES

En un principio, los ensayos para el estudio de la actividad enzimática de RepB y OBD se llevaron a cabo empleando un único oligo que poseía el sitio de corte específico. El problema de usar este oligo como sustrato es que, debido a la actividad de transferencia de cadena de RepB y OBD, la mayor parte de las moléculas de oligo que habían sido cortadas eran reconstituidas por la proteína y la actividad aparente de corte era mucho menor que la real. En estas primeras aproximaciones, la reacción tuvo lugar en 30 μ l de tampón B suplementado con 2 mM de $MnCl_2$ y con una concentración final de 130 mM de NaCl. Las mezclas de reacción contenían 0,5 μ M del oligo fx23 (tabla 3) y proteína en el rango de 0,15 a 0,3 μ M. La reacción de corte se llevó a cabo durante 10 min a 37 °C y se detuvo añadiendo 5 μ l de EDTA 0,25 M. El volumen de la reacción se incrementó hasta 100 μ l con agua (Milli-Q) y la mezcla fue enfriada en una mezcla de agua y hielo. Seguidamente se precipitó el DNA añadiendo 10 μ l de acetato sódico 3 M pH 7, 300 μ l de EtOH 100% y 2 μ l del co-precipitante Pellet paint. Tras al menos 1 h a -20 °C, el DNA precipitado se recuperó por centrifugación durante 45 min a 14.700 xg y 4 °C. Después de retirar el sobrenadante,

el pellet de DNA precipitado se lavó con 200 μ l de EtOH 80%. Tras centrifugar durante 15 min a 14.700 xg y 4 °C se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado al aire. El pellet de DNA se disolvió en 2 μ l de agua (Milli-Q) y 3 μ l de formamida desionizada al 50%. Tras 3 min a 95 °C, la mezcla se enfrió rápidamente en una mezcla de hielo y agua, y se añadió 1 μ l de solución BXF. Las muestras resultantes de este proceso, que contenían los productos de la actividad enzimática, se analizaron en geles desnaturalizantes de PAA al 20% y urea 8 M en formato miniprotean. Tras la electroforesis, que se llevó a cabo a una potencia constante de 5 W, los geles fueron teñidos con Gel Red y visualizados con la ayuda de un equipo Gel Doc.

Para poder estudiar la actividad endonucleolítica sin que la actividad de transferencia de cadena distorsionara los resultados, así como para analizar la propia actividad de transferencia de cadena, se realizaron experimentos similares a los anteriores con la salvedad de que se adicionó un exceso molecular de 10 veces del oligo ST12 (tabla 3). Este oligo proporciona el extremo 3'-OH que sirve de sustrato para la reacción de transferencia de cadena, impidiendo así la religación del oligo sustrato que contiene la secuencia de corte. Como consecuencia de la unión del oligo ST12 al oligo 8-mer, resultante del corte, se generó un nuevo oligo de 20-mer. En varios experimentos de este trabajo, en vez de ST12 se empleó ST30, que, asociado al producto de 8-mer, dio lugar a un oligo de 38-mer. En cualquier caso, tras someter las muestras a electroforesis, se observaron cuatro bandas correspondientes al oligo fx23 (23-mer), el oligo añadido en exceso (12 o 30-mer), el producto de transferencia de cadena (20 o 38-mer) y el producto del corte (15-mer). El otro producto de corte, de 8-mer, no fue detectado.

La cuantificación de la intensidad de cada una de las bandas y el subsiguiente ajuste, para corregir los valores obtenidos en función de la longitud del fragmento correspondiente, nos permitió determinar la fracción molecular de cada especie de DNA.

23. DETECCIÓN DE LOS ADUCTOS COVALENTES OBD-DNA Y RepB₆-DNA

Con anterioridad a esta tesis se había intentado sin éxito detectar el aducto covalente entre OBD o RepB₆ y el ssDNA, resultante de la actividad endonucleolítica de la proteína. En este trabajo hemos conseguido detectar el aducto basándonos en la estrategia de Asano, Higashitani et al. (Asano, Higashitani et al. 1999), en la que se

emplea SDS para detener la reacción enzimática. En nuestro caso fue suficiente un 0,1% de SDS para parar la reacción y añadir un 0,05% de SDS, tanto en el gel, como en el tampón de carrera. De esta forma la proteína permanece desplegada y el complejo adquiere una carga neta negativa que permite su migración en el gel durante el transcurso de la electroforesis.

En estos ensayos se empleó el oligo fx23f, que está marcado fluorescentemente en el extremo 3', y en algunos casos también se adicionó oligo ST12 en un exceso de 10 veces para tener en consideración la actividad de transferencia de cadena. Se determinó que la relación molar DNA:proteína óptima era 1:20; a relaciones superiores de proteína de hasta 1:60 no se observó incremento de la formación de aducto. Generalmente se emplearon unas concentraciones en torno a 0,2 μ M de DNA y 4 μ M de proteína, y cuando se pretendió obtener una mayor cantidad de aducto se mantuvo la relación pero se incrementaron las concentraciones hasta 1 μ M de DNA y 20 μ M de proteína. La reacción normalmente se llevó a cabo en 20 μ l de tampón B suplementado con 2 mM de Mn^{2+} . La concentración final de NaCl fue 130 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 37 °C, aunque también se probaron tiempos dentro de un rango de 15 s a 30 min. Tras la incubación, la reacción se detuvo con 0,1% de SDS, que se adicionó junto al tampón de carga BXGE, y la mezcla se calentó durante 3 min a 95 °C. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de PAA al 10% con 0,3% de SDS, cuya longitud fue de 22 cm. Al tampón de electroforesis también se le adicionó 0,3% de SDS. Como control de peso molecular se empleó *Precision Plus Protein Standards*. La detección de la fluorescencia emitida por los oligos se realizó mediante el sistema Phosphorimager FLA-3000 empleando las condiciones habituales.

La detección del aducto covalente también se realizó mediante *Western blot* del siguiente modo: tras realizar el ensayo descrito en el párrafo anterior, con la salvedad de que el marcador de peso molecular utilizado fue *Precision Plus Protein Western C Standards*, el gel se equilibró con el tampón Towbin. Por otro lado, una membrana de PVDF se sumergió en MetOH, a continuación en agua (Milli-Q) y finalmente también fue equilibrada en tampón Towbin. Las proteínas se electro-transfirieron a la membrana de PVDF utilizando el sistema de transferencia semi-seco *Trans-Blot Turbo Blotting* (Bio-Rad). A continuación, la membrana se sometió a dos lavados de 10 min con el tampón TTBS en agitación suave y a temperatura ambiente, seguidos del bloqueo con caseína, para el que la membrana se incubó con 50 ml de TBS suplementado con caseína al 0,2% en agitación muy lenta durante 2-3 h. Tras dos

lavados de 10 min con TTBS, se procedió a la incubación con 40 ml de tampón TTBS suplementado con 0,2% de caseína y una dilución 1:30.000 del anticuerpo primario durante un mínimo de 2 h. Para eliminar los restos de anticuerpo primario no unido se realizaron dos lavados de 10 min cada uno con TTBS. Después, la membrana se incubó durante 2 h con TTBS suplementado con 0,2% de caseína y una dilución 1:30.000 del anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Tras lavar dos veces con TTBS para eliminar los restos de anticuerpo secundario no unido, se reveló la membrana con el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad), que contiene el sustrato quimioluminiscente luminol, cuya oxidación es catalizada por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno; inmediatamente después de ser oxidado el luminol pasa de su estado excitado a su estado basal emitiendo luz. A continuación la membrana fue envuelta en film transparente para evitar que se secase y se visualizó en el detector de quimioluminiscencia LAS-3000. La membrana también fue incubada con una dilución 1:10.000 de *Strep Tactin-HRP conjugate*, que permite detectar las proteínas del marcador molecular cargadas en el gel.

24. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE RepB, OBD Y SUS FORMAS MUTANTES SOBRE OLIGOS FLUORESCENTES. DIGESTIÓN DEL ADUCTO COVALENTE CON PROTEINASA K.

Otro método mediante el que se detectó el aducto consistió en el uso de proteinasa K tras la reacción enzimática para que la parte peptídica del aducto se viera reducida a unos pocos aminoácidos, de forma que se pudieran visualizar simultáneamente en geles de pequeño tamaño todos los productos marcados fluorescentemente (el oligo cortado, el producto de transferencia de cadena y el aducto covalente). Para este tipo de ensayo se utilizó el oligo fx23+4f3' marcado con Cy5 en el extremo 3' y se añadió un exceso de 10 veces del oligo ST30. La secuencia del oligo fx23+4f3' es la del oligo fx23 pero con una extensión de 4 nt en el extremo 3'. Las concentraciones de proteína y oligo variaron en función de los intereses subyacentes a cada experimento. La reacción se llevó a cabo en tampón B suplementado con 7,5 μ M de Mn^{2+} y la concentración total de NaCl fue 130 mM, salvo que se indique otra concentración. La incubación, que se llevó a cabo a 37 °C, tuvo una duración de 5 min. A continuación, para detener la reacción y cortar la proteína, se añadieron 0,1% de SDS y 125 μ g/ml de proteinasa K, y se realizó una incubación de 15 min a 37 °C. Seguidamente se adicionó el tampón de carga BXGE, se calentó la muestra durante 3 min a 95 °C y se procedió a la electroforesis en geles de 7 cm de longitud conteniendo

PAA al 20% y urea 6 M. La visualización del gel se llevó a cabo mediante el sistema Phosphorimager FLA-3000 bajo las condiciones habituales.

25. SOBREPDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RepB

Para purificar RepB se siguió el protocolo descrito en (Ruiz-Masó, López-Zumel et al. 2004). Para ello se prepararon 4 l de cultivo de la estirpe *E. coli* BL21DE3 conteniendo el plásmido pGEMrepB en medio TY suplementado con 200 µg/ml de Ap. El cultivo se incubó a 37 °C y fuerte agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. A continuación se indujo la expresión de repB adicionando 1 mM de IPTG y el cultivo se incubó durante 30 min; seguidamente se añadió 200 µg/ml de rifampicina disuelta en DMSO y se prolongó la incubación otros 70 min. El cultivo inducido se sometió a centrifugación a 14.872 xg y 4 °C y el sedimento bacteriano se resuspendió en 160 ml de tampón H suplementado con 1 M de NaCl. La suspensión celular se congeló y descongeló rápidamente aumentando así el rendimiento de la lisis, que se llevó a cabo pasando la suspensión celular dos veces por una prensa French a una presión de 8,3 MPa. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 30 min a 10.600 xg y 4 °C, y conservamos el sobrenadante, donde RepB se encontraba disuelta. Para eliminar los ácidos nucleicos se añadió al sobrenadante polietilenimina (PEI) a una concentración de 0,2% (v/v) y se incubó durante 30 min con agitación lenta y a 4 °C. El precipitado se eliminó por centrifugación durante 20 min a 10.600 xg y 4 °C. A continuación se añadió, paulatinamente, con agitación lenta y a 0 °C, sulfato amónico a un 70% de saturación; se mantuvo la incubación durante 1 h en esas condiciones y las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación durante 20 min a 10.600 xg y 4 °C. El sedimento proteico se disolvió en 140 ml de tampón H suplementado con 1 M de NaCl y se dializó frente a 12 l de tampón H sin sal, llevando a cabo tres cambios de tampón. En estas condiciones de baja fuerza iónica RepB precipita selectivamente. El precipitado se recogió por centrifugación y se disolvió en 160 ml de tampón H suplementado con 300 mM de NaCl. La muestra se aplicó, a un flujo aproximado de 1 ml/min, en una columna de heparina-agarosa con un diámetro de 2,5 cm y 90 ml de volumen, equilibrada con el mismo tampón. Se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna de dicho tampón, tras lo cual las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron mediante 400 ml de un gradiente lineal de 300 a 600 mM de NaCl, seguido de un flujo isocrático a 600 mM hasta completar la elución de la proteína. Se recogieron fracciones de 5 ml y se analizó su contenido mediante electroforesis en geles de PAA-

SDS tras la precipitación proteica con TCA. Las fracciones que contenían RepB se juntaron y fueron dializadas frente a 3 l de tampón H suplementado con 300 mM de NaCl, llevando a cabo tres cambios de tampón. Como última etapa de purificación de la proteína, las fracciones seleccionadas en el anterior paso de purificación fueron aplicadas a la misma columna de heparina-agarosa equilibrada de igual forma. Después del lavado con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, se aplicó un segundo gradiente lineal (140 ml) de 0,3 a 1 M de NaCl. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron del mismo modo que tras la cromatografía anterior. Las fracciones centrales del pico de RepB, que eluyó aproximadamente a 425 mM de NaCl, fueron las de mayor pureza y concentración, por lo que se seleccionaron y dializaron frente a tampón 1 M NaCl, llevándose a cabo tres cambios de tampón. La solución de RepB fue concentrada por filtración a través de filtros Macrosep y Microsep, con un tamaño medio de poro de 3,5 kDa, hasta que la concentración de la proteína fue de 10-20 mg/ml.

A continuación se concentró la muestra y se purificó mediante cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare). La fase móvil fue tampón H suplementado con 1 M de NaCl. Las muestras se volvieron a analizar en PAA-SDS, juntando las fracciones centrales del pico de elución.

La actividad de cada lote de proteína purificada se analizó mediante EMSA tal y como se explica en el apartado 18. El porcentaje de proteína activa fue siempre superior al 90%.

La concentración de RepB se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, o bien mediante Qubit 2.0. Se obtuvo una estimación aproximada del contenido en ácidos nucleicos contaminantes a partir de la relación de absorbancia a 280 y 260 nm. Finalmente la proteína se almacenó a -80 °C.

26. SOBREPRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PcrASpn

Se prepararon 2 l de cultivo de la estirpe *E. coli* M15[pREP4] conteniendo el plásmido pQE1-PCR, el cual codifica la proteína His₆-PcrASpn, en TY suplementado con 100 µg/ml Ap y 25 µg/ml Km. El cultivo se incubó con fuerte agitación y a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. En ese momento se adicionó 1 mM de IPTG para inducir la producción de His-PcrA y el cultivo se incubó durante 1 h

a 30 °C en las mismas condiciones. A continuación, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con tampón H suplementado con 50 mM de NaCl. La suspensión celular se llevó a cabo en 40 ml de tampón LIS suplementado con el inhibidor de proteasas *Complete Mix* sin EDTA (Roche) y se congeló y descongeló para incrementar la eficiencia de la lisis, que se llevó a cabo pasando la suspensión celular dos veces por la prensa French. A continuación se centrifugó la mezcla durante 30 min a 10.600 xg y 4 °C. El sobrenadante se inyectó en una columna His Trap HP, previamente equilibrada con tampón LIS, y seguidamente se pasaron por la columna 22 volúmenes de dicho tampón para eliminar la mayor parte de proteínas contaminantes. Para separar la proteína de la resina se aplicó un flujo isocrático con 4 volúmenes de una mezcla con 34% de tampón ELU y el resto de tampón LIS y a continuación se adicionaron 16 volúmenes de tampón ELU al 100%. Se recogieron fracciones de 5 ml y su contenido se analizó mediante electroforesis en geles de PAA-SDS. Las fracciones seleccionadas fueron reunidas y dializadas en tampón A. La proteína se concentró hasta un volumen de aproximadamente 1 ml mediante filtración centrífuga con dispositivos Vivaspín que contenían un filtro con un tamaño promedio de poro de 3 kDa, a 7.500 xg y 4°C. Seguidamente, la muestra se sometió a cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 HiLoad, previamente equilibrada con tampón A. Mediante SDS-PAGE se seleccionaron las fracciones que contenían una mayor proporción de PcrA, se juntaron y fueron concentradas hasta un volumen aproximado de 1 ml con Vivaspín por centrifugación a 7.500 xg y 4 °C. Se determinó la concentración de proteína mediante Nanodrop o Qubit y se guardó a -80 °C.

27. ENSAYOS DE ACTIVIDAD HELICASA DE PcrASpn

Se analizó la actividad de PcrA sobre el oligo Top3tailCy5-Bot3taildu. Dicho oligo es parcialmente bicatenario; la cadena que se encuentra totalmente hibridada presenta el fluoróforo Cy5 en 5' para monitorizar la separación de cadenas, y la otra cadena contiene una ristra de Ts en 3' que constituye la región monocatenaria del oligo donde PcrA establece su interacción inicial.

Los ensayos de actividad helicasa se llevaron a cabo en 10 µl de tampón HEL suplementado con 2-6 nM de oligo sustrato y un rango de concentración de proteína comprendido entre 2 y 90 nM. La reacción tuvo lugar durante 20 min a 37 °C, y seguidamente se detuvo añadiendo el tampón de carga BXGE suplementado con 1%

de SDS. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 10%. Para conseguir una óptima separación de las bandas se utilizaron geles de 15 cm de longitud y 0,75 mm de grosor, y se aplicó un amperaje constante de 25 mA.

28. ENSAYOS DE *FOOTPRINTING*

Esta técnica se basa en la medida de la accesibilidad al DNA que presenta una serie de agentes modificadores del DNA. Los agentes pueden ser sustancias químicas o enzimas que son capaces de cortar el esqueleto del DNA o de modificar sus bases. El sustrato de estas reacciones es un fragmento de DNA lineal, aunque también es posible utilizar DNA plasmídico superenrollado, que contiene la secuencia específica de unión de una proteína. Las regiones del DNA contactadas por la proteína aparecen, por lo general, protegidas frente a la acción de este tipo de agentes, en comparación con el perfil del DNA sin proteína.

Los perfiles de *footprinting* van a depender del agente que utilicemos. El radical hidroxilo (OH●) presenta una serie de características, como independencia de secuencia, alta resolución (1 pb), reacción de corte compatible con la mayoría de tampones, que aconsejan su uso frente a otros agentes. El dimetil sulfato (DMS) es un agente químico con un uso muy extendido para analizar las interacciones proteína-DNA. El DMS metila preferentemente el nitrógeno-7 de la guanina (G) y el nitrógeno-3 de la adenina (A), de manera que la reactividad con los residuos G sucede por el surco mayor y con los residuos A por el surco menor (Shaw and Stewart 1994). La alteración de la reactividad de los residuos frente al DMS por la unión de una proteína puede producir tanto la reducción de la metilación como el aumento de la misma. En resumen, la combinación de la información de alta resolución de los contactos de la proteína con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA, proporcionada por el *footprinting* con OH●, con la que proporcionan los agentes que modifican directamente las bases del DNA, como el DMS, es útil para construir un mapa preciso de las interacciones de una proteína con su DNA específico.

28.1. ENSAYOS DE *FOOTPRINTING* SOBRE DNA LINEAL

Estos ensayos se realizaron para determinar los contactos que se establecen entre OBD o His₆-OBD y el oligo que contiene las 3 DDRs, 3DDR, con una u otra cadena marcada radiactivamente en 5'.

En las reacciones de unión se mezclaron 4 nM de oligo, 1,6-6 µM de OBD o 0,3-1,2 µM de His₆-OBD y 10 µg/ml de poly(dI-dC) en 50 µl de tampón B, durante 30 min a 25 °C. El tratamiento con OH• se inició con la adición de 9 µl de la mezcla reactiva [Fe(II)-EDTA, H₂O₂ y ascorbato sódico] preparada como se describe en (del Solar, Pérez-Martín et al. 1990). Las reacciones se pararon, tras 5 min de incubación a 25 °C, con 15 µl de una solución 0,1 mM de tiourea y 20 mM de EDTA. A continuación, el DNA libre se separó del unido a proteína mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 5%. Las bandas de DNA correspondientes se purificaron y analizaron en geles de secuencia de PAA al 8% y 7 M de urea. Para identificar las regiones protegidas se incluyeron en los geles las reacciones de secuenciación química del mismo fragmento.

Los ensayos de *footprinting* con DMS se realizaron como se describe en (Papavassiliou 1993) y (Sasse-Dwight and Gralla 1991). Las reacciones de unión se prepararon como se describe en el párrafo anterior y de nuevo el DNA libre se separó del unido a proteína mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 5%. Se recortaron las bandas y se trataron separadamente como se explica a continuación: se sumergió la banda en una solución 0,2% (v/v) de DMS. Tras 5 min de incubación a 25 °C, la reacción de metilación se paró con una solución 0,5 M de β-ME. A continuación el DNA se eluyó de la matriz del gel mediante la incubación durante toda la noche a 42 °C en tampón EO. El DNA eluido se recuperó por precipitación con etanol tras dos extracciones orgánicas consecutivas, primero con una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo isoamílico (24:1) y a continuación con cloroformo-isoamílico (24:1). El DNA sedimentado se disolvió en agua (Milli-Q) para ser digerido con 10 M de piperidina a 100 °C. Finalmente se procedió al análisis en geles de secuencia como se indica en el párrafo anterior.

29. ANÁLISIS DE AFINIDAD DE LOS COMPLEJOS PROTEÍNA-DNA MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE

El fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*) permite el análisis de la interacción entre biomoléculas. El biosensor correspondiente, en nuestro caso Biacore 2000 (GE Healthcare), monitoriza de forma precisa y en tiempo real la interacción entre ligando y analito. La detección de la señal requiere un sistema óptico y un chip sensor, constituido por un sustrato de vidrio y una finísima capa de oro, sobre la cual se encuentra una matriz hidrófoba de dextrano. El chip sensor forma parte del sistema por el cual circulan las disoluciones de analito y en su superficie se encuentra anclado el ligando. La superficie opuesta está en contacto con el prisma óptico, que enfoca la luz polarizada hacia el chip sensor para que, a continuación, sea reflejada hacia un detector de diodos. En la figura 8A se muestra de modo esquemático el funcionamiento del sistema Biacore.

El fundamento de SPR se basa en la noción de la onda evanescente. Si consideramos la interfase entre dos medios, 1 y 2, en este caso vidrio y fase acuosa, con índices de refracción n_1 y n_2 respectivamente ($n_1 > n_2$), cuando el ángulo de incidencia de la luz es superior a un ángulo crítico, la luz incidente se refleja y no hay refracción en el medio 2. Si ocurre lo contrario con respecto al ángulo de incidencia se crea una onda evanescente en la interfase. Esta onda evanescente no se propaga y su intensidad decae exponencialmente al aumentar la distancia a la interfase. Dicho fenómeno se llama reflexión interna total. En situación de reflexión interna total, los plasmones superficiales (oscilaciones colectivas de conducción de electrones) del metal se acoplan con la onda evanescente y resuenan. Las condiciones para llegar a esta resonancia de los plasmones de superficie dependen de la longitud de onda, la polarización y el ángulo de la luz incidente, pero también de las propiedades de la capa metálica y del medio sobre la superficie. La única variable son los cambios en el índice de refracción de la fase acuosa, que son debidos a las variaciones de masa producidas por la interacción entre las biomoléculas sometidas a estudio, de modo que el ángulo de resonancia variará únicamente como resultado de dichas interacciones.

El diagrama en el que se representa la variación del ángulo de resonancia (en unidades de resonancia, RU) frente al tiempo se denomina sensograma. En la figura 8B se presenta el sensograma de un experimento típico de SPR. Previamente al ensayo se inmoviliza el ligando en el chip sensor. A continuación se aplica un flujo

constante de solución de analito, que produce el aumento de la señal como resultado de la asociación ligando-analito. La disociación comienza cuando deja de circular la solución de analito y el flujo continuo lo conforma únicamente el tampón de dicha solución. Finalmente se inyecta una solución regeneradora que elimina de la superficie del chip sensor el analito que pudiera quedar unido y el sensograma revierte a la línea base inicial.

En este trabajo se recurrió a la tecnología de SPR para continuar el estudio de la interacción de RepB₆ u OBD con las diferentes secuencias del *dso* susceptibles de interaccionar con la proteína iniciadora. También estudiamos la posible formación de un complejo ternario compuesto por la interacción entre RepB₆, PcrASpn y el DNA.

Se empleó el sensor chip SA (GE Healthcare), cuya matriz estaba constituida por dextrano carboximetilado y estreptavidina, lo que permitió la inmovilización de ligandos biotinilados. Los ligandos empleados fueron oligos que contenían los diferentes elementos de unión a proteína del *dso* y, en todos los casos, una de las cadenas se encontraba biotinilada en 5' y poseía una ristra de Ts adicional para evitar impedimentos estéricos entre la proteína de interés y la biotina. Para la inmovilización se utilizó una disolución 3,3 nM de oligo, previamente anillado, en tampón TNE filtrado y desgasificado; la inmovilización se prolongó hasta alcanzar un incremento de la señal de 100 RU. Un chip sensor posee cuatro canales, por lo que uno quedó libre como control y en el resto se inmovilizaron tres oligos diferentes.

El analito fue diluido en tampón HBS-EP. Tras la optimización de las condiciones, las concentraciones empleadas fueron 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 μ M en los ensayos de OBD; 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 y 0,06 μ M en los de RepB₆, y 0,03, 0,06, 0,12, 0,24 y 0,48 μ M en los de PcrA. La inyección de la solución de proteína se llevó a cabo en los cuatro canales del chip, empleando un flujo de 10 μ l/min durante 2 min, y fue seguida de un flujo de tampón HBS-EP en el periodo de disociación. A continuación el chip sensor se regeneró con 0,1% SDS, conservándose intacta la capacidad de unión a proteína del DNA. Este proceso se repitió para cada una de las concentraciones de proteína mencionadas anteriormente.

Las inyecciones de proteína para cada una de las concentraciones anteriores se llevaron a cabo en los cuatro canales del chip, empleándose un flujo de 10 μ l/min durante 2 min, y fueron seguidas de un flujo de tampón HBS-EP en el periodo de

disociación. A continuación el chip sensor se regeneró con 0,1% SDS, conservándose intacta la capacidad de unión a proteína del DNA, para proceder con el siguiente ciclo.

Para el análisis de los sensogramas se emplearon el programa BIAevaluation.

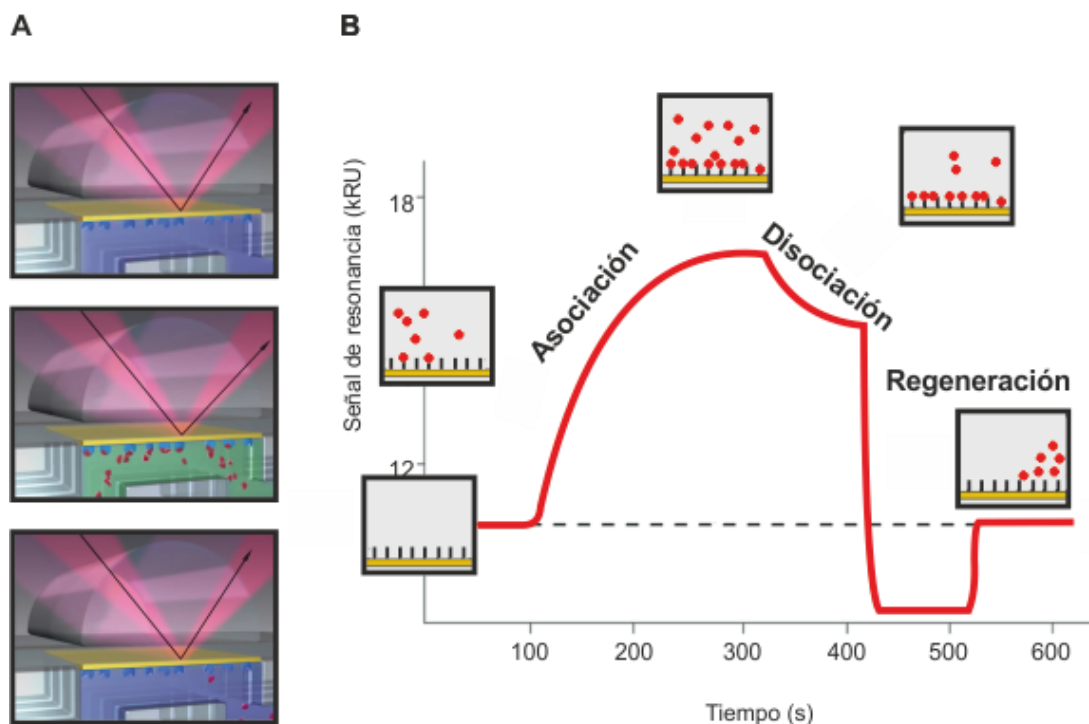


Figura 8. **Esquema de un ensayo típico con el sistema Biacore y sensograma correspondiente.** (A) Secuencia de sucesos en un ensayo de SPR que analiza la interacción entre ligando y analito. Las moléculas de ligando (azul) permanecen ancladas en todo momento a la superficie del chip sensor que forma parte del sistema por el cual circulan las disoluciones de analito; la superficie opuesta de este se encuentra en contacto con el prisma óptico, que enfoca la luz polarizada hacia el chip sensor para que a continuación sea reflejada hacia un detector de diodos (no mostrado en el esquema). En la imagen superior, los ligandos están libres pues todavía no se ha inyectado la solución de analito, únicamente hay un flujo continuo de tampón; por consiguiente no se observan variaciones en el ángulo de resonancia. En la imagen inmediatamente inferior se observa que la solución de analito ya se ha inyectado y que algunas moléculas de ligando se encuentran unidas a moléculas de analito (rojo). El incremento de la cantidad de moléculas de ligando asociadas a analito implica un mayor ángulo de resonancia. En la imagen inferior, tras un corto periodo de tiempo en el que el sistema se ha sometido a flujo continuo de tampón sin analito, todas las moléculas de ligando están libres y el ángulo de resonancia vuelve a ser el inicial. (B) Sensograma correspondiente al ensayo explicado anteriormente. El eje de abscisas corresponde al tiempo y el de ordenadas al ángulo de resonancia medido en RU. En la etapa de asociación, el ángulo de resonancia aumenta hasta alcanzar el equilibrio. En el momento en el que la solución con analito se sustituye por únicamente tampón, el ángulo de resonancia disminuye conforme se disocian moléculas de ligando y analito, esta etapa se conoce como disociación. En la etapa de regeneración se prepara el chip sensor para un nuevo ensayo.

30. DELECCIONES E INSERCIONES ENTRE PDRs Y DDRs DE pMV158, Y ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS RESULTANTES EN *S. pneumoniae*.

Para modificar la distancia entre los loci *nic* y *bind* de pMV158, las mutaciones no se realizaron directamente en pMV158, sino que primeramente se llevaron a cabo en el vector pALTER-PstI, que contiene el fragmento pequeño PstI de pLSI, y a continuación dicho fragmento modificado se intercambió con el nativo de pMV158. Para realizar las delecciones se empleó PCR inversa (Ochman, Gerber et al. 1988) y para las inserciones, mutagénesis dirigida. En los casos en los que realizamos PCR inversa, previamente a la mutagénesis se fosforilaron los oligos en 5', tal y como se describe en el punto 10 de este capítulo, para posibilitar su ligación posterior; cuando se trató de mutagénesis dirigida con el kit geneArt no fue necesario. Tras la mutagénesis el plásmido modificado se purificó. La extracción del plásmido se llevó a cabo utilizando los sistemas QIAquick o NZYTech, aunque con QIAquick se obtuvo mayor eficiencia. Para los casos en los que se empleó PCR inversa se realizó la ligación del plásmido pALTER-PstI modificado linealizado y se comprobó, por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, que la ligación sucedió correctamente. Los productos de la ligación se precipitaron con 1-butanol y se disolvieron en agua destilada estéril para eliminar las sales. Los vectores pALTER-PstI modificados, y sin modificar, como control, se introdujeron mediante electroporación en células de *E. coli* JM109 que seguidamente fueron sembradas en placas de TY agar suplementado con 15 µg/ml de Tc. Se realizaron minipreparaciones de varias colonias para asegurarnos, mediante secuenciación, de que se había introducido correctamente la modificación. Adicionalmente, en los casos en los que se realizó inserción se introdujo el sitio de corte de BamHI, por lo que previamente a la secuenciación se digirió con dicha enzima para comprobar si el fragmento adicional se había introducido, y en caso afirmativo se secuenció. A continuación, los DNAs tanto de pMV158 como de los plásmidos recombinantes modificados o no modificados (para el control) se digirieron con PstI, con el objetivo de aislar los fragmentos a intercambiar (el fragmento pequeño, en el caso de los DNAs recombinantes, y el fragmento grande, en el caso de pMV158) mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. Tras purificar los fragmentos, se procedió a su ligación enzimática empleando una relación molecular 1:1. Se transformó *S. pneumoniae* con cada uno de los plásmidos y se sembraron los cultivos correspondientes en medio sólido en presencia de 1 µg/ml Tc, tal y como se describe en el apartado 2.2 de Materiales, lo que permitió seleccionar las colonias de bacterias portadoras del plásmido, bien modificado o sin modificar, ya que este les reporta

resistencia a Tc. A continuación los plásmidos portados se obtuvieron mediante extracción alcalina y fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB (Secugen).

31. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PROTEÍNAS

El dicroísmo circular (CD) se ha convertido en la técnica estándar para medir la actividad óptica de las proteínas. La luz polarizada en un plano es la suma de dos componentes de luz polarizada circularmente a derechas e izquierdas. Una muestra con actividad óptica absorberá cada uno de estos dos componentes en distinta cantidad, de manera que el vector resultante describirá una elipse, donde la relación entre el eje mayor y el menor es una medida de la elipticidad. Los cromóforos de las proteínas no son quirales y no presentan actividad óptica, por lo que su señal de CD está asociada a la asimetría óptica de su entrono. La señal de CD se observa en la misma región espectral donde se encuentran las bandas de absorción de un determinado compuesto. En proteínas, Trp, Tyr y Phe son los principales cromóforos en el UV cercano (240-320 nm), mientras que el enlace peptídico es el principal cromóforo en el UV lejano o región amida. Las bandas de CD en la región amida contienen información sobre los enlaces peptídicos y la estructura secundaria de la proteína, y se usan con frecuencia para seguir cambios en la estructura secundaria en el transcurso de transiciones estructurales. La contribución más importante en el espectro de CD de una proteína en la región amida la realiza la hélice α , mientras que la contribución de las otras estructuras secundarias está peor definida. El espectro de dicroísmo de las proteínas sometidas a estudio fue adquirido con un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un controlador de temperatura tipo "peltier". La proteína purificada fue equilibrada por diálisis en el tampón CD, y diluida en este mismo tampón hasta una concentración de 30 u 80 μ M para la adquisición del espectro en el UV lejano y cercano, respectivamente. El espectro en el UV lejano fue adquirido en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0,1 o 1 mm y en un rango de longitud de onda de 190 a 260 nm. El espectro fue el resultado de cuatro acumulaciones, a una velocidad de barrido de 20 nm/min, un ancho de banda de 1 nm y una respuesta de 4 segundos. El espectro en el UV cercano fue adquirido en las mismas condiciones, en cubetas de 1 cm de paso óptico y un rango de longitud de onda de 250 a 300 nm. En ambos casos, los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo, tras la sustracción del espectro del tampón, según la expresión:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \times 100 \times M_r}{c \times l \times n}$$

θ es la elipticidad medida en grados, c es la concentración de la proteína en mg/ml, l es el paso óptico en cm, M_r es el peso molecular de la proteína y n es el número de residuos de la proteína. Las unidades de $[\theta]_{MRW}$ son grados \times cm² \times dmol⁻¹. La elipticidad molar por residuo calculada se representó frente a la longitud de onda. Para obtener información estructural, los datos de CD en el UV lejano se analizaron con cuatro programas diferentes: CONTIN, que implementa el algoritmo de regresión “ridge” de Provencher y Glockner (Provencher and Glockner 1981); SELCON, que incorpora un método auto-consistente junto con un algoritmo de descomposición de valores únicos para asignar estructuras secundarias de proteínas (Sreerama and Woody 2000); CDNN (Böhm, Muhr et al. 1992) y K2D (Andrade, Chacón et al. 1993), que son métodos para el análisis de espectros de CD mediante el uso de redes neurales.

RESULTADOS

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE OBD/RepB₆ Y
*dso***

Para dilucidar los primeros pasos de la replicación de pMV158 es necesario caracterizar las interacciones que se establecen entre RepB y los diferentes elementos de unión a la proteína en ambos loci del *dso*. Previamente a este trabajo se determinó que el locus *bind*, compuesto por tres repeticiones directas de 11 pb (DDRs), es el sitio de unión primario para RepB. Por su parte, el sitio de unión secundario es atribuido al locus *nic*, compuesto por dos repeticiones directas de 7 pb (PDRs) y una repetición invertida (IR-I) capaz de constituir una horquilla con la secuencia específica de corte en el lazo. Adicionalmente se observó que los complejos formados por unión de la proteína al sitio primario son mucho más estables que los establecidos con el secundario (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007).

Para la purificación de RepB se empleó el sistema de expresión de *E. coli* y se obtuvo la conformación hexamérica de la proteína. El hecho de que RepB purificada presentara la forma hexamérica en lugar de la monomérica fue determinante a la hora de diseñar los experimentos; para el estudio de la interacción de un solo protómero recurrimos al dominio OBD, encargado de la unión a DNA, el cual se encuentra como monómero en solución debido a que el único responsable de la oligomerización es el dominio OD. Consideramos la información referente a la interacción entre OBD y DNA extrapolable a un protómero del hexámero, ya que las estructuras cristalinas de RepB₆ y OBD reflejan que el plegamiento de OBD es prácticamente idéntico en ambos casos.

Los experimentos con los que abordamos este primer objetivo fueron realizados con la proteína purificada y desprendida de la etiqueta His₆ que facilitó su purificación. La metodología empleada para la obtención de la proteína se encuentra descrita en Métodos. Respecto al DNA diana, se empleó una batería de oligos para simular las diferentes regiones del *dso* susceptibles de interaccionar con RepB.

1. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE UNIÓN DE OBD/RepB₆ A LAS REPETICIONES DIRECTAS DEL *dso*

Para simular cada una de las tres DDRs que constituyen el locus *bind* se diseñaron tres oligos de 19 pb con la secuencia de una DDR flanqueada por los 3-5 pb adyacentes correspondientes a cada repetición (DDRL, DDRC y DDDR; figura 9). También se diseñó un oligo con una única repetición flanqueada por los pb adyacentes al tándem de tres DDRs (1DDR), así como otro oligo con la secuencia de las tres DDRs flanqueadas por los mismos pb adyacentes (3DDR) (figura 9). En lo referente a las PDRs, se utilizaron tanto un oligo de 17 pb constituido por una única PDR

flanqueada por los pb adyacentes a las PDRs (1PDR), como un oligo de 22 pb con las dos PDRs flanqueadas por estos mismos pb (2PDR) (figura 9). Como control se emplearon oligos de similar longitud y secuencia inespecífica.

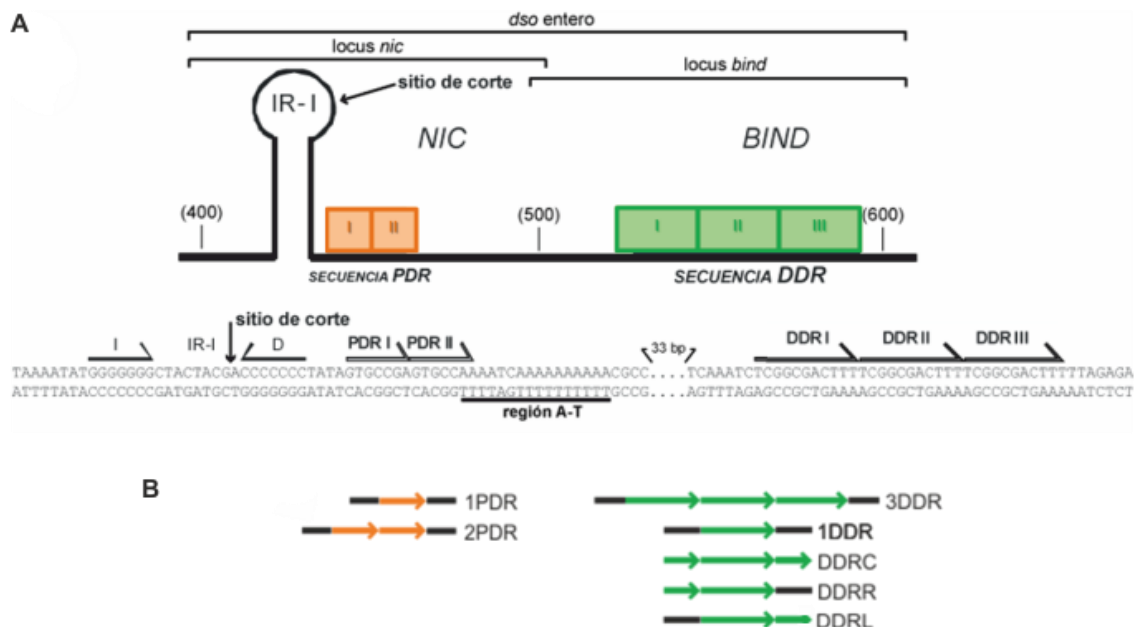


Figura 9. **Esquema del *dso* de pMV158 y de los oligos representativos de las repeticiones directas.** (A) El *dso* se divide en dos loci: el locus *bind* está constituido únicamente por las repeticiones directas DDRs, mientras que el locus *nic* contiene las repeticiones directas PDRs y la repetición invertida IR-I. Cuando se extruye la horquilla correspondiente a IR-I, el sitio de corte por RepB se encuentra como DNA monocatenario. (B) Las repeticiones directas de ambos loci son los sitios de unión de RepB en el *dso*. Con el objetivo de analizar la interacción frente a cada repetición se diseñaron los oligos bicatenarios representados en el esquema.

Se estudió mediante EMSA la interacción entre la batería de oligos descrita en el párrafo anterior y OBD. Inicialmente se realizó un sondeo con oligos no marcados, y a continuación se procedió a la determinación de las constantes de disociación en el equilibrio con oligos de igual secuencia pero marcados fluorescentemente. En la mezcla de reacción se añadió 20 nM de oligo y concentraciones crecientes de proteína en un rango de 0,5-50 μ M, lo que resultó en la formación de los correspondientes complejos proteína-DNA. Cada ensayo se realizó por triplicado y se determinó la K_d y la B_{max} asociada. Para ello, se cuantificaron con el programa QuantityOne las bandas correspondientes al DNA libre y al DNA unido a la proteína; a continuación, utilizando el programa SigmaPlot, se representó el porcentaje de DNA en forma de complejo frente a la concentración de proteína; los datos resultantes se ajustaron al modelo cuya ecuación describe la unión de un ligando a un único sitio (figura 10 y tabla 6).

Con el objetivo de concluir si las diferencias de afinidad para las interacciones entre OBD y los distintos oligos eran significativas se realizó el análisis ANOVA, para lo que se recurrió al Servicio de Estadística del CIB. De este modo se determinó que no existían diferencias significativas en referencia a la afinidad de unión de OBD a cualquiera de los oligos que contienen una única DDR, mientras que la afinidad por 2PDR sí parece ser ligeramente menor. Cabe destacar que en los EMSAs con 2PDR se observa una única banda de complejo para concentraciones moderadas de proteína, pero a concentraciones elevadas aparecen bandas adicionales que no sabemos justificar. Por otra parte la K_d para 1PDR no se pudo determinar, puesto que únicamente se observó interacción lábil y no una banda definida, y lo mismo sucedió con el oligo inespecífico NNOE. En ambos casos se realizó el ensayo aumentando la concentración del oligo hasta 100 y 200 nM, pero se obtuvo el mismo resultado. Adicionalmente, los ensayos con los oligos 1PDR y 2PDR se realizaron a concentraciones más bajas de NaCl (60 mM en lugar de 300 mM) y tampoco se observó ningún cambio. Estos resultados fueron imprevistos, ya que cabía esperar que cada PDR interaccionara con una molécula de proteína, dando lugar a una banda definida con el oligo 1PDR y dos bandas en el caso de 2PDR. Cabe, pues, la posibilidad de que las dos PDRs sean un único elemento de interacción y no dos como se pensaba. Los valores de K_d y B_{max} obtenidos en los experimentos de unión de OBD a las repeticiones directas se muestran en la tabla 6.

La afinidad de unión de OBD por las distintas secuencias del *dso* se analizó también mediante SPR, empleando oligos que contenían las mismas secuencias que los utilizados en EMSA más una ristra de seis Ts precedida de una molécula de biotina en el extremo 5' de una de las cadenas, lo que permitía su inmovilización al chip sensor. En la figura 11 se muestran los sensogramas relativos a la unión de OBD con 1DDRb, 2PDRb y NNOEb, así como las gráficas en las que se representa la señal (RU) en el equilibrio para cada una de las cinco concentraciones de proteína analizadas. Gracias al ajuste de los datos representados en dichas gráficas al modelo cuya ecuación describe la unión de un ligando a un único sitio se pudieron determinar los valores de K_d (tabla 7). Los resultados mostraron de nuevo una menor afinidad de OBD por dos PDRs en comparación con la afinidad por una DDR.

Tabla 6. K_d y B_{max} , determinadas mediante ensayos de EMSA, para la interacción entre OBD y los oligos que simulan las repeticiones del *dso*.

Oligo	K_d (μ M)	B_{max}
DDRCf	1,1 \pm 0,1	51 \pm 1
DDRLf	1,3 \pm 0,1	60 \pm 1
DDRRf	1,1 \pm 0,1	60 \pm 1
1DDRf	1,2 \pm 0,1	58 \pm 1
2PDRf	2,1 \pm 0,1	81 \pm 1

Para determinar la afinidad de RepB₆ frente a un DDR se realizaron EMSAs en los que se empleó 20 nM de DDRC y 0,6-23,5 μ M de proteína. La electroforesis se llevó a cabo en geles nativos de 6% de PAA para permitir la entrada del complejo en el gel. Se observó que el DNA libre disminuía conforme aumentaba la concentración de proteína, pero no se visualizó la banda correspondiente al complejo (figura 10B). El carácter electropositivo del complejo RepB₆-DDRC, debido al pequeño tamaño del oligo y al elevado punto isoeléctrico de la proteína (8,75), podría impedir que el complejo migre hacia el polo positivo durante la electroforesis en las condiciones ensayadas. Para intentar solventar esta situación decidimos aumentar el pH de la reacción de unión y del tampón de electroforesis hasta valores de 8,5 y 9, de modo que la carga neta de la proteína fuera neutra y la carga negativa del oligo posibilitara la migración hacia el cátodo, pero no se consiguió observar la banda correspondiente al complejo y en consecuencia no se pudo determinar la K_d . Se trató de determinar una constante de afinidad relativa (K_{rel}) de RepB₆ por competición con OBD por unirse a DDRC. Con este propósito se realizó un EMSA en el que añadimos simultáneamente OBD y RepB₆. En las reacciones control, donde únicamente añadimos OBD, se observó la formación del complejo esperado OBD-DDRC; por el contrario, en las reacciones de unión donde añadimos ambas proteínas no se detectó ningún complejo, indicando que RepB₆ está desplazando a OBD en la unión a DDRC y que en consecuencia la afinidad de RepB₆ por DDRC es mayor que la que presenta OBD, aunque su magnitud no se pueda determinar por este método.

Las afinidades entre el hexámero RepB₆ y los elementos de unión a la proteína del *dso* se analizaron también por SPR (figura 11 y tabla 7). El análisis de datos generados en los ensayos con RepB₆ no se pudo llevar a cabo con el programa BIAevaluation ya que los sensogramas no se ajustan adecuadamente a los modelos que incluye el programa. Por ello dedujimos un valor aproximado de las K_d representando la señal (RU) en el equilibrio para cada una de las cinco

concentraciones de proteína analizadas. Los sensogramas mostraron una mayor afinidad de la forma hexamérica respecto a OBD, con unas diferencias entre las K_d de más de un orden de magnitud, tanto para 1DDR como para 2PDR e incluso para DNA no específico (figura 11 y tabla 7). Estas diferencias podrían deberse a la menor velocidad de disociación que refleja la etapa de disociación de los sensogramas de RepB₆ en comparación con los de OBD. En cualquier caso, el hecho de que la afinidad de RepB₆ por 1DDR sea superior a la de OBD por el mismo oligo fue un resultado inesperado ya que tanto para RepB₆ como para OBD un único dominio OBD se encontraría interaccionando específicamente con el DNA. Una posible explicación a estas observaciones es que la existencia de seis superficies iguales de interacción en RepB₆ facilitaría que una molécula de DNA que se disocie de un determinado protómero se una inmediatamente a cualquiera de los otros 5 protómeros cercanos.

Por otra parte, si comparamos el valor de K_d para la unión entre RepB₆ y los oligos de secuencia específica 1DDR, 3DDR y 2PDR con el valor obtenido para la unión al DNA inespecífico NNOE veremos que son prácticamente iguales (tabla 7). Estos resultados de afinidad obtenidos por SPR contradicen las observaciones previas obtenidas de experimentos de EMSA, según los cuales RepB₆ se une con preferencia al DNA que contiene las tres DDRs frente al que solo tiene dos o una DDR, y la afinidad que presenta por el DNA del locus *bind* es unas 500 veces superior que por el DNA del locus *nic* (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007). Las diferencias en la afinidad de RepB₆ por el DNA del *dso* observadas entre ambos métodos podrían deberse a la sensibilidad diferencial de los mismos dependiendo de la naturaleza de las interacciones proteína-DNA. Cabe destacar en este sentido que las condiciones de concentración de sal, que podrían afectar especialmente a las interacciones electrostáticas, difieren en EMSA (NaCl 300 mM) y SPR (NaCl 150 mM).

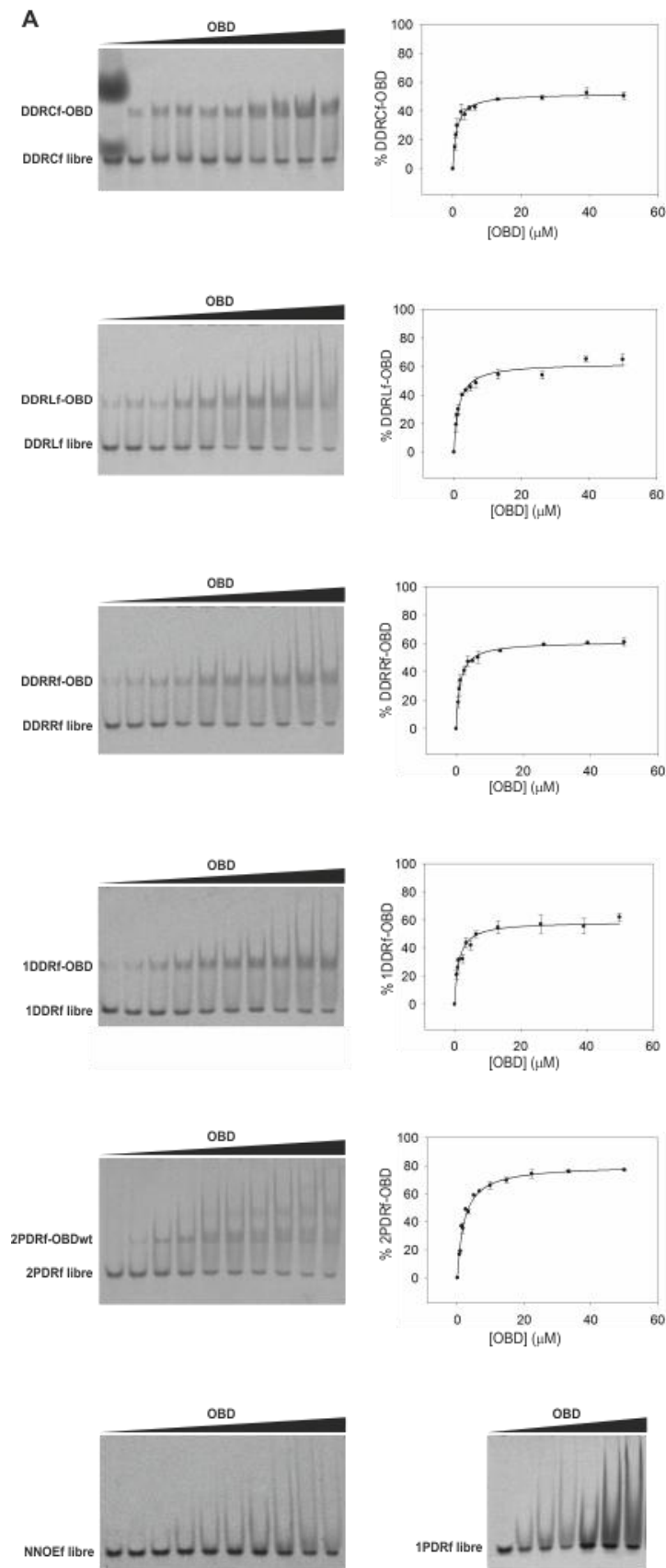


Figura 10. **Determinación mediante EMSA de la afinidad de OBD y RepB₆ por las diferentes repeticiones directas del *dso*.** (A) Ensayos de afinidad para OBD: se incubó 20 nM de oligo con concentraciones crecientes de OBD en un rango de 0,5-50 μ M, con una concentración final de NaCl de 300 mM, durante 20 min a una temperatura de 22 °C. La afinidad de unión de OBD a una DDR fue superior que a una PDR e incluso que a dos PDRs. No se observaron diferencias entre las distintas DDRs. (B) Ensayos de afinidad para RepB₆: Con este tipo de ensayo no se detectó complejo para RepB₆.

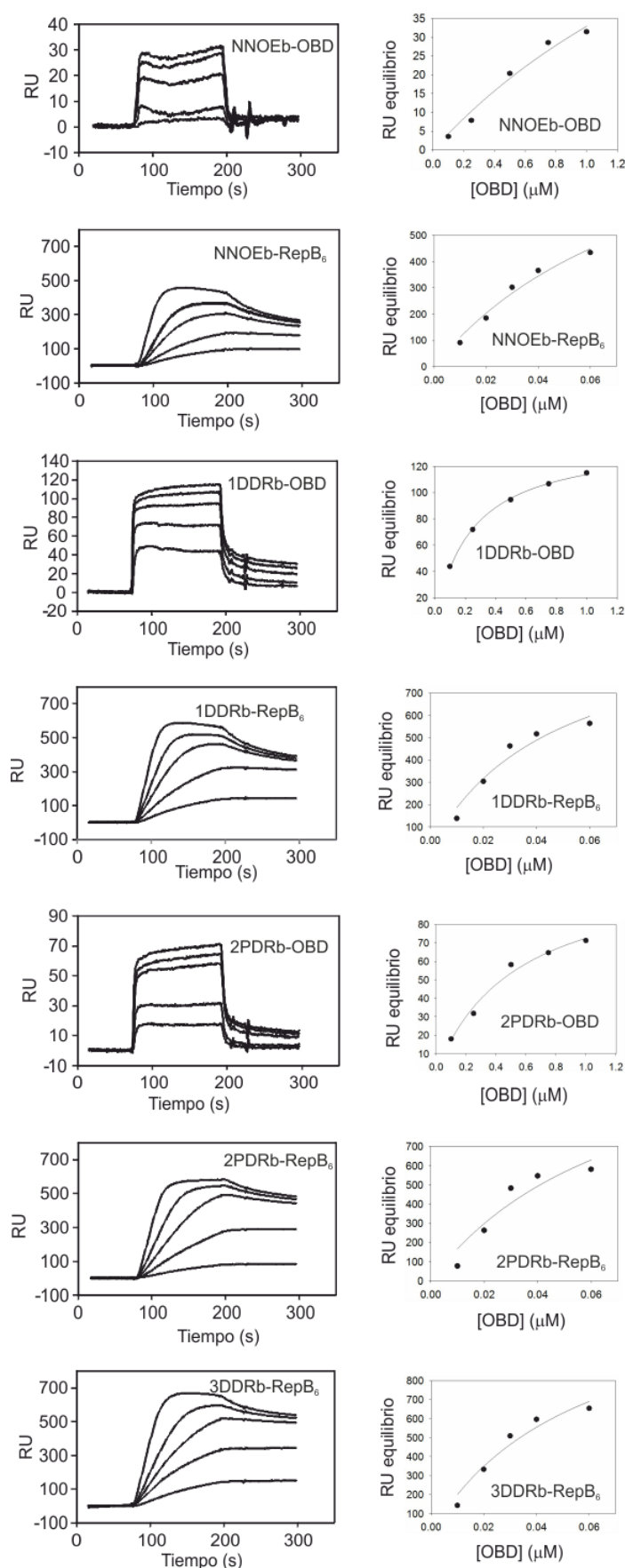


Figura 11. **Determinación mediante SPR de la afinidad de OBD/RepB₆ por las diferentes repeticiones directas del *dso*.**

Las concentraciones de proteína empleadas fueron 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 μM en los ensayos de OBD, y 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 y 0,06 μM en los del hexámero RepB₆. En ambos casos la proteína fue diluida en tampón HBS-EP. De cada concentración se inyectó en el sistema un flujo de 10 μl/min durante 2 min. Los sensogramas reflejan una menor afinidad de OBD por dos PDRs que por una DDR. En referencia a los ensayos con RepB₆, se observa un incremento de la afinidad respecto a los ensayos de OBD para todos los oligos. Para determinar de modo aproximado las K_d y B_{max} se representó la señal (RU) en el equilibrio para cada una de las cinco concentraciones de proteína analizadas.

Tabla 7. Valores aproximados de K_d y B_{max} , determinados mediante ensayos de SPR, para la interacción entre OBD/ RepB₆ y los oligos que simulan las repeticiones del *dso*.

Proteína	Oligo	K_d (μ M)	B_{max}
OBD	NNOEb	3 \pm 2	121 \pm 81
RepB ₆	NNOEb	0,09 \pm 0,04	1135 \pm 362
OBD	1DDRb	0,23 \pm 0,01	140 \pm 2
RepB ₆	1DDRb	0,05 \pm 0,02	1062 \pm 279
OBD	2PDRb	0,5 \pm 0,1	112 \pm 13
RepB ₆	2PDRb	0,08 \pm 0,07	1414 \pm 882
RepB ₆	3DDRb	0,06 \pm 0,03	1350 \pm 404

2. INFLUENCIA DE LA ETIQUETA DE His EN LA UNIÓN DE OBD A DNA

La determinación de la estructura cristalográfica de OBD unida a DNA se llevó a cabo con OBD fusionada a 6 His en el extremo N-terminal. Para confirmar que los residuos adicionales no interfirieron en la unión al DNA y que estos cristales son representativos de la unión real que se produce entre proteína y DNA, se analizó la posible implicación de la etiqueta de His₆ en la dicha interacción.

El primer paso fue la obtención de dos variantes de la proteína, una con los residuos adicionales y otra sin ellos, que fueron sometidas a condiciones similares. De esta forma, las posibles diferencias de afinidad por el DNA se podrían atribuir a la etiqueta de His₆ y no al deterioro sufrido durante el proceso de eliminación de los residuos His₆. Con este propósito, se llevó a cabo el protocolo de eliminación de la etiqueta His₆ de 1 mg de OBD y en paralelo se simuló la eliminación de His₆ de la misma cantidad de solución de OBD. En dicha simulación, la proteína conservó la etiqueta His₆, no se mezcló con las enzimas del kit TAGZyme ni se pasó por la columna de níquel, cuya única finalidad es sustraer las peptidasas de la muestra; sin embargo, fue sometida tanto a las diluciones pertinentes con los diferentes tampones de las enzimas, como a las asociadas a los pasos de cromatografía, así como a los periodos de incubación y pasos de concentración sucesivos. A continuación se determinó con exactitud la concentración de ambas proteínas. También se determinó el porcentaje de proteína activa, para lo que se realizaron EMSAs en condiciones de exceso de DNA y se asumió que aquella proteína capaz de unirse a DNA era proteína activa enzimáticamente; este tipo de ensayo queda descrito en detalle en el apartado

18 de Métodos. En condiciones de 950 nM de proteína frente a 4 μ M de oligo total (DDRRf completado con DDRR), el 22% del DNA formó complejo al tratarse con OBD-His₆ frente al 12% al tratarse con OBD sin His, por lo que el porcentaje de proteína activa fue 88% para OBD con His y 46% para OBD sin His (figura 12A). Una vez conocida la concentración y el porcentaje de proteína activa tanto de la proteína con etiqueta de His como de la proteína sin etiqueta, se analizó su afinidad por el DNA diana mediante EMSAs empleando 0,3-9 μ M de proteína y 20 nM de oligo total (DDRRf completado con DDRR). Se observó una mayor afinidad en el caso de la proteína sin etiqueta de His que para la proteína con etiqueta de His, siendo la K_d de esta última unas 4 veces superior (figura 12B). Sin embargo, esta diferencia de afinidad resulta cuestionable, ya que los carriles correspondientes a OBD con His parecen reflejar unos niveles de interacciones inespecíficas superiores a los de OBD sin His, que dan lugar a un *smear* por encima de las bandas correspondientes tanto al DNA libre como al complejo específico, dificultando la cuantificación de las mismas.

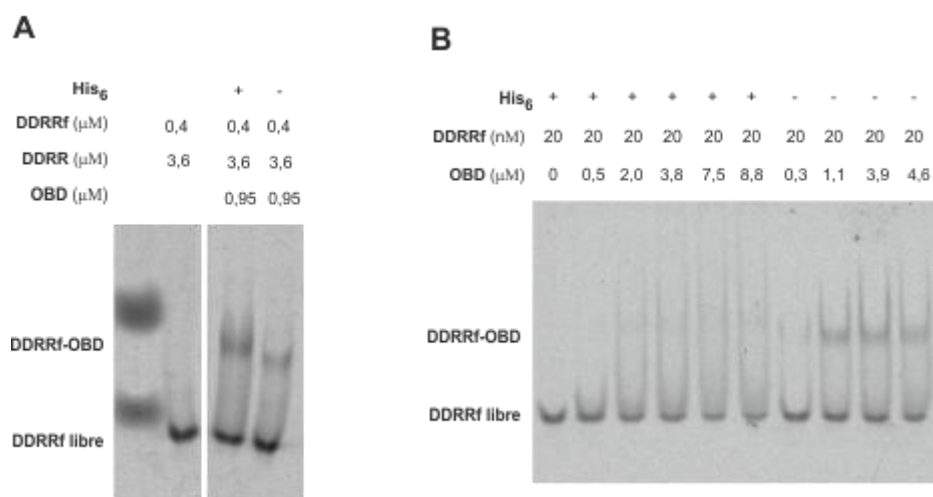


Figura 12. **Experimentos de EMSA para la interacción entre una DDR y OBD con y sin etiqueta His₆.** (A) Para determinar el porcentaje de proteína activa se incubó 4 μ M de oligo total con 0,95 μ M de proteína; la concentración final de NaCl fue 300 mM y la incubación tuvo una duración de 20 min y se desarrolló a 22 °C. El porcentaje de proteína activa fue 88% para OBD con His y 46% para OBD sin His. (B) Para comparar la afinidad de ambas proteínas por una DDR se incubó 20 nM de oligo con 0,3-9 μ M de proteína, la concentración final de NaCl fue 300 mM y la incubación tuvo una duración de 20 min y se desarrolló a 22 °C. Se observó una mayor afinidad en el caso de la proteína sin etiqueta de His que para la proteína con etiqueta de His, siendo la K_d de esta última unas 4 veces superior.

3. ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE LOS CONTACTOS ENTRE OBD Y EL DNA DEL *dso*

Los contactos que se establecen tanto en la interacción entre OBD y un fragmento de DNA de 42 pb que contienen la secuencia de las tres DDRs, como en la interacción entre OBD fusionada a la etiqueta de His₆ y ese mismo fragmento de DNA, fueron analizados mediante ensayos de *footprinting* con DMS (figura 13A) y OH● (figura 13B), tal y como se describe en el apartado 28 de Métodos. Se analizaron los complejos C2 y C3 generados por la unión de OBD (con y sin His₆) a las DDRs, empleando para ello fragmentos de DNA marcados en el extremo 5' de una u otra cadena (codificante o no-codificante). Asimismo, los contactos identificados fueron comparados con los establecidos por RepB₆ (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007) (figura 13C).

Los ensayos de *footprinting* revelaron la inexistencia de diferencias entre los contactos establecidos por OBD con y sin His₆ con las DDRs. Los patrones de las bases protegidas de la metilación y de las bases hipermetiladas, así como los patrones de las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por OH● son esencialmente los mismos tanto en el caso de OBD con His₆ como en el de OBD sin His₆ (figura 13).

Respecto a la comparación con los contactos establecidos entre RepB₆ y las DDRs, además de observarse diferencias en cuanto a las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por OH●, lo que probablemente es debido a la diferente conformación de una y otra proteína, aparecen ciertas bases hipermetiladas (Cs) en los ensayos de RepB₆ que no se observan en los de OBD (figura 13). Puesto que la metilación en C sólo es posible si hay una fuerte distorsión del DNA, este resultado parece coherente con la capacidad de curvar el DNA de la forma hexamérica de RepB.

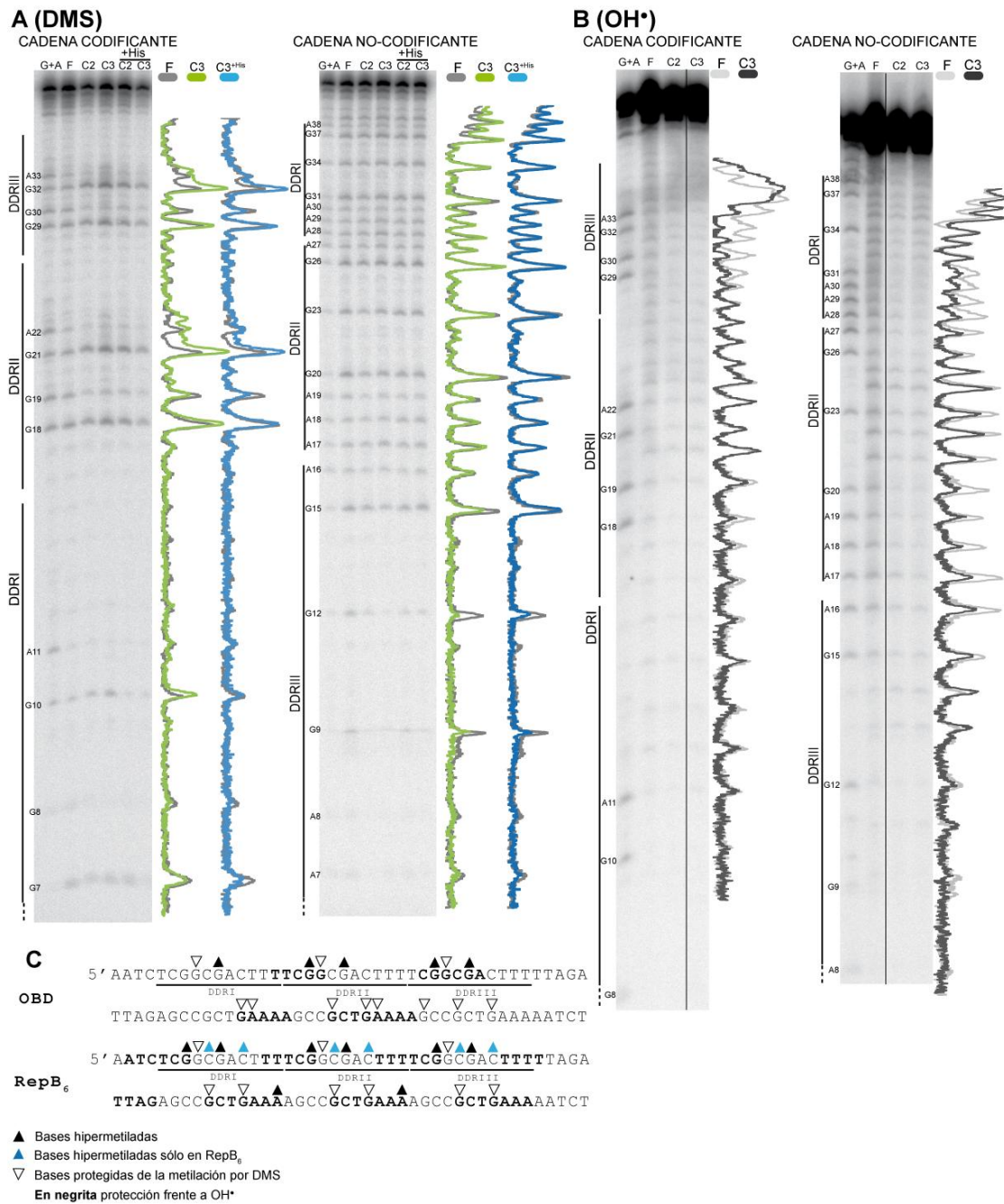


Figura 13. **Identificación de los contactos de OBD (con y sin His₆) con el DNA del locus *bind* y comparación con los que se identificaron para RepB₆.** (A) Perfil de metilación por DMS del DNA del locus *bind* unido a OBD. Un fragmento de DNA de 42 pb que contiene la secuencia de las tres DDRs marcado radiactivamente en su extremo 5' se incubó con la versión nativa de OBD o la que conservaba la etiqueta de seis histidinas (+His). Los complejos fueron tratados con DMS como se describe en el apartado 28 de Métodos. Los geles de secuencia muestran el perfil de modificación de la región 5' de la cadena codificante o no-codificante. A la derecha de la imagen del gel se muestran los densitogramas del DNA sin proteína (en gris claro) y de los complejos C3 obtenidos de la unión entre la proteína nativa OBD (verde) o con la etiqueta +His (azul) y el DNA del locus *bind*. A la izquierda de la imagen del gel se indican tanto la posición de las repeticiones directas con unas barras verticales como las bases metiladas en la secuencia del fragmento de DNA utilizado. Calles: F, DNA libre; C2 y C3, DNAs

de los complejos 2 y 3; C2^{+His} y C3^{+His}, DNAs de los complejos 2 y 3 obtenidos con OBD con la etiqueta +His; G+A, marcador de secuencia para purinas de Maxam y Gilbert. (B) Un fragmento de DNA de 42 pb que contiene la secuencia de las tres repeticiones directas del locus *bind* marcado radiactivamente en su extremo 5' se incubó con la versión nativa de OBD. Los complejos fueron tratados con OH● como se describe en el apartado 28 de Métodos. Los geles de secuencia muestran el perfil de modificación de la región 5' de la cadena codificante o no-codificante. A la derecha de la imagen del gel se muestran los densitogramas del DNA libre (en gris claro) y del complejo C3 (en negro) obtenidos de la unión entre la proteína nativa OBD y el DNA del locus *bind*. A la izquierda de la imagen del gel se indica la posición de las repeticiones directas con unas barras verticales. Calles: F, DNA libre; C2 y C3, DNAs de los complejos 2 y 3; G+A, marcador de secuencia para purinas de Maxam y Gilbert. (C) Resumen de los contactos que se establecen entre OBD y el locus *bind* y comparación con los que se identificaron para RepB₆. Las bases con una sensibilidad al DMS incrementada se indican por triángulos negros. Los triángulos azules indican las bases hipermetiladas que únicamente se observan al analizar los contactos con RepB₆. Las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por OH● se muestran en negrita sobre la secuencia de nucleótidos.

4. DETERMINACIÓN DE LOS ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE RepB₆ IMPLICADOS EN UNIÓN A DNA

Antes de que se resolviera la estructura cristalina de OBD unida a un oligo con la secuencia de 2 DDRs, se estableció la hipótesis de que los elementos de RepB₆ implicados en la unión a DNA debían ser la hélice $\alpha 2$ y el extremo N-terminal. Dicha hipótesis se apoyaba en tres premisas:

i) Tanto el potencial electrostático de la superficie interna del canal de RepB₆ como el de la superficie del surco definido entre los dos trímeros de OBDs en la forma cristalina C2 de la proteína son positivos (figura 14A). Por ello, son dos regiones potencialmente capaces de unir DNA, aunque las dimensiones del canal sólo le permitirían albergar ssDNA.

ii) La reconstrucción mediante microscopía electrónica de las partículas de RepB₆ libre y unida al dsDNA del locus *bind*, y la comparación entre dichas partículas, reveló que el complejo presentaba un incremento de densidad electrónica que ocluía el surco entre los dos trímeros de OBDs de RepB₆ (figura 14A), indicando que el reconocimiento del DNA específico del origen se produce mediante residuos localizados en esa región, la cual contiene una cantidad significativa de residuos básicos aportados tanto por la hélice $\alpha 2$ como por el extremo N-terminal.

iii) La superposición del OBD de RepB con el de la proteína iniciadora de la replicación del virus adeno-asociado AAV5, también perteneciente a la superfamilia de endonucleasas HUH, unida al DNA específico del origen viral, nos permitió identificar dos elementos de RepB posiblemente implicados en la unión al DNA: la hélice $\alpha 2$ y el extremo N-terminal (figura 14B). Ambos elementos presentan una posición equivalente a la de la hélice C de la proteína viral, que junto con el lazo $\beta 4$ - $\beta 5$ constituyen los elementos de unión al DNA del origen viral.

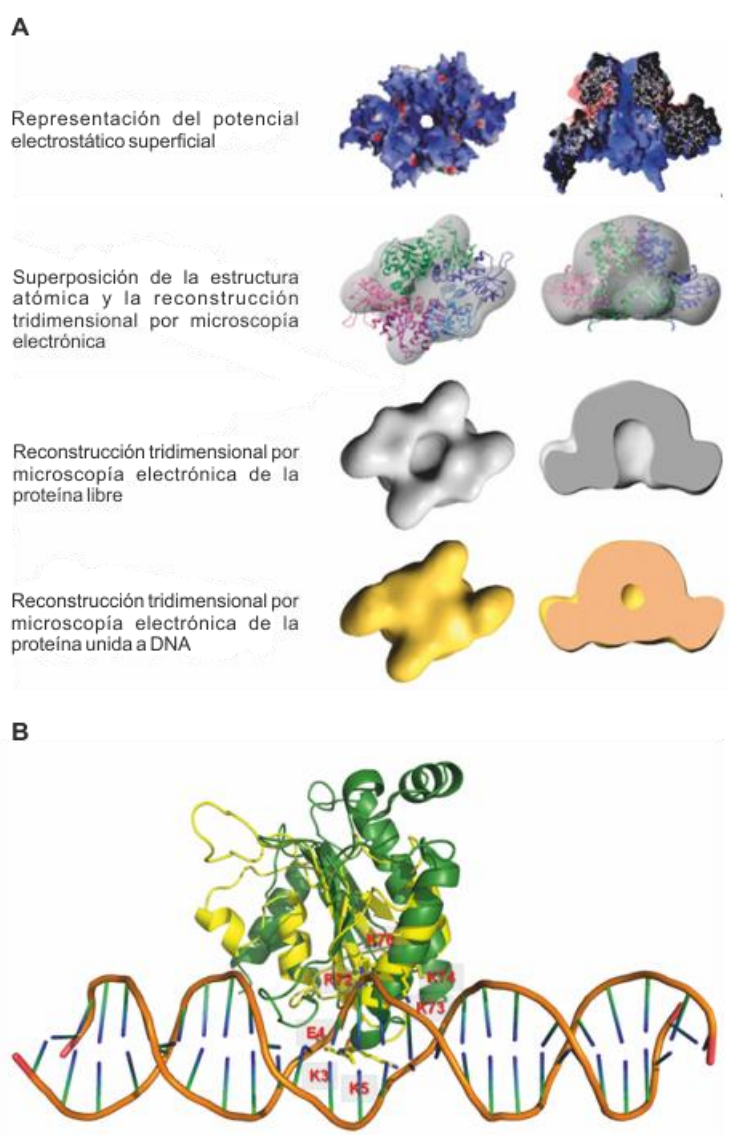


Figura 14. **Primera aproximación para la identificación de las regiones de RepB implicadas en la unión a DNA.** Dicha aproximación es anterior a la resolución de la estructura del complejo OBD-2DDR_s por cristalografía de rayos X. (A) En la parte superior se muestra una representación del potencial electrostático en la que se aprecia el carácter electropositivo del surco delimitado por dos trímeros de RepB. A continuación se presenta la superposición de la estructura atómica de la proteína y la reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica. Por último se muestran imágenes de la

reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de microscopía electrónica de la proteína hexamérica (izquierda) y de un corte longitudinal de la misma (derecha), en ausencia y en presencia de DNA. La comparación de ambas imágenes pone de manifiesto la oclusión del surco en presencia de DNA. (B) Superposición del OBD de RepB (amarillo) con el de la proteína iniciadora de la replicación del virus adeno-asociado AAV5 (verde) unido al DNA específico del origen viral. Dicha superposición sitúa a los elementos hélice $\alpha 2$ y extremo N-terminal de RepB interaccionando con el DNA.

Basándonos en esta hipótesis, se generaron mutantes en los que algunos de los residuos potencialmente responsables de la unión a DNA, y que adicionalmente se encontraban conservados en las Rep de plásmidos de la subfamilia de pMV158, se sustituyeron por alanina. Los mutantes presentaban sustituciones ya sea en la hélice $\alpha 2$: OBD^{R72A}, OBD^{K76A} y OBD^{R72K73K74K76A}, o en el extremo N-terminal: OBD^{E4A}, OBD^{K5A} y OBD^{K3E4K5A}.

La resolución de la estructura del complejo proteína-DNA formado entre dos moléculas de OBD y una molécula de un oligo con 2 DDRs (figura 15), llevada a cabo por el grupo del Prof. Miquel Coll en colaboración con nuestro grupo, confirmó la hipótesis inicial y reveló dos elementos más implicados en la unión a DNA: los bucles entre la hélice $\alpha 2$ y la hebra $\beta 4$ y entre la hebra $\beta 3$ y la hélice $\alpha 2$. Asimismo, se observó que la proteína se une por el surco mayor del DNA y que la mayoría de los contactos se establecen con el esqueleto azúcar-fosfato de éste. Lo mismo sucede con el lazo $\beta 4$ y $\beta 5$ de la Rep de AAV5, aunque la hélice C de la proteína viral contacta por el surco menor del DNA (figura 14B). Los residuos del OBD que participan en la unión a DNA son: K3 y K5 localizados en el extremo N-terminal; T67, en el bucle entre $\beta 3$ y $\alpha 2$; D69, S70, R72, K73, K74 y K76, en $\alpha 2$; M86, V87 y Q88, en el bucle entre $\alpha 2$ y $\beta 4$.

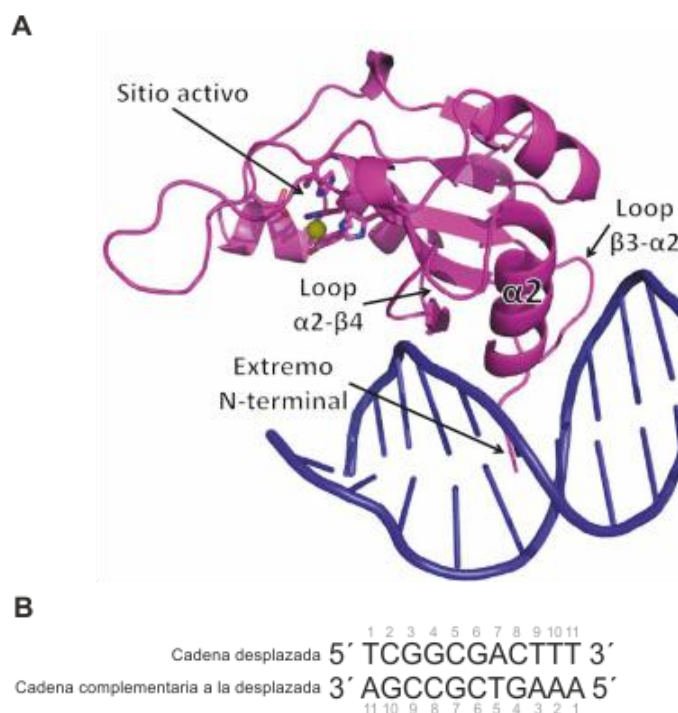


Figura 15. **Estructura cristalina por difracción de rayos X del complejo OBD-DDR.** (A) La interacción de OBD con el DNA del locus *bind* se produce en el surco mayor y participan el extremo N-terminal, la hélice $\alpha 2$ y los bucles a ambos lados de la misma. Los residuos del OBD que participan son K3 y K5 localizados en el extremo N-terminal; T67, en el bucle entre $\beta 3$ y $\alpha 2$; D69, S70, R72, K73, K74 y K76, en $\alpha 2$; M86, V87 y Q88, en el bucle entre $\alpha 2$ y $\beta 4$. Cabe destacar que el sitio activo queda alejado de la molécula de ADN. (B) Secuencia numerada de una DDR. La cadena desplazada es la que sufre el corte en el inicio de la replicación de pMV158.

La mayor parte de las interacciones son inespecíficas y se forman mediante puentes de hidrógeno, con la excepción de las establecidas por K5, T67, V66 y S70 con el grupo fosfato 5' de la T5 de la cadena complementaria a la desplazada, que son interacciones hidrofóbicas. Se observan, sin embargo, dos residuos que establecen interacciones específicas: en primer lugar D69, además de formar un bolsillo hidrofóbico junto a S70 donde se aloja la T5 de la cadena complementaria a la desplazada, interacciona a través de su grupo carboxilo con el N4 de la C5 de la cadena desplazada, y en segundo lugar K3 parece interaccionar con las guaninas cercanas, aunque la resolución de sólo 3 Å de la estructura del co-cristal impide determinar con claridad los detalles de la interacción.

Respecto al DNA presente en la estructura, se trata de un DNA tipo B cuyo ángulo de giro de las bases es 33,02°, siendo el clásico de 34,6°. En consecuencia cada vuelta de hélice contiene 11 pb, por lo que las 3 DDRs, cuya longitud es 11 pb, se encuentran en la misma posición con respecto a la doble hélice del DNA.

Para completar la información aportada por la estructura del complejo, además de los mutantes mencionados anteriormente, se generó OBD^{D69A}, por ser D69 responsable de la única interacción específica caracterizada con total claridad en la estructura cristalográfica.

Se realizaron EMSAs para determinar las K_d y B_{max} de los mutantes de OBD mencionados frente al oligo 1DDRf (figura 16 y tabla 8). Con el objetivo de concluir si las diferencias de afinidad eran significativas se empleó el análisis ANOVA, para lo que se recurrió al Servicio de Estadística del CIB. Las sustituciones de los residuos K5 y R72 provocaron una ligera disminución de la capacidad de unión al DNA; el mutante OBD^{K76A} presentó dicha actividad moderadamente comprometida, y el mutante OBD^{D69A} perdió su capacidad para establecer interacciones específicas, puesto que no se observó una banda definida, sino una estela a lo largo de toda la calle. Este resultado concuerda con la información aportada por la estructura, que revela el carácter específico de la interacción establecida por D69. El mutante múltiple OBD^{R72K73K74K76A} presentó una capacidad de unión muy deteriorada. Por otra parte, la unión a DNA del mutante con E4 sustituido se vió ligeramente favorecida. No fuimos capaces de sustituir únicamente la K3, responsable de la posible segunda interacción específica; sin embargo, los EMSAs con OBD^{K3E4K5A} muestran una banda definida correspondiente al complejo, lo que podría sugerir una mayor relevancia de D69 respecto a K3 en lo referente a capacidad de unión a DNA, aunque se debe tener en cuenta que la unión a DNA de este triple mutante puede verse favorecida por la sustitución de E4 por A.

Adicionalmente se estudió la actividad enzimática de los mutantes mencionados, siguiendo la metodología descrita en el apartado 24 de Métodos, y no se observaron diferencias significativas respecto a la actividad de OBD (resultados no mostrados).

Tabla 8. K_d y B_{max} , determinadas mediante ensayos de EMSA, para la interacción entre las formas mutantes de OBD y el oligo 1DDRf

Proteína	K_d (μ M)	B_{max}
OBD	1,2 \pm 0,1	58 \pm 1
OBD ^{E4A}	0,6 \pm 0,1	67 \pm 2
OBD ^{K5A}	1,8 \pm 0,2	49 \pm 1
OBD ^{K3E4K5}	1,1 \pm 0,1	62 \pm 1
OBD ^{R72A}	1,7 \pm 0,2	52 \pm 2
OBD ^{K76A}	5,5 \pm 0,7	44 \pm 2

Resultados - Análisis de la interacción entre OBD/RepB₆ y *dso*

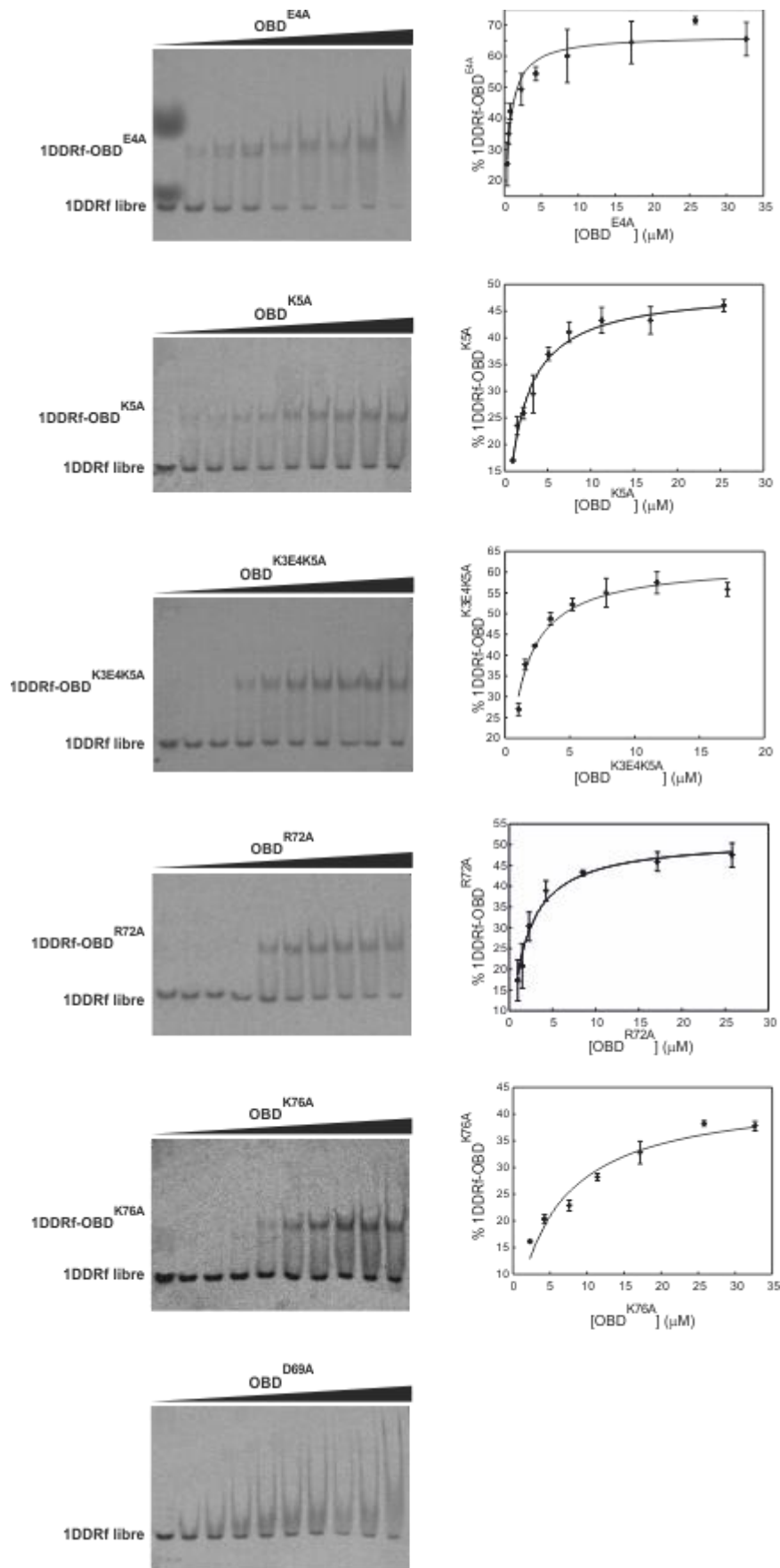


Figura 16. **Análisis mediante EMSA de la interacción entre una DDR y los diferentes mutantes de unión del OBD.** Se incubó el DNA (20 nM) con concentraciones crecientes, en un rango de 0,5-35 μ M, de cada una de las variantes de OBD. La reacción se llevó a cabo en tampón B suplementado con 300 mM de NaCl y las muestras se incubaron durante 20 min a 22 °C. Cabe destacar la drástica pérdida de capacidad de unión a DNA del mutante OBD^{D69A}. El mutante con la sustitución en K76, que a diferencia de D69 interacciona con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA, presentó una capacidad de unión moderadamente disminuida.

5. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE OBD/RepB₆ Y LA ESTRUCTURA CRUCIFORME IR-I DEL *dso*

Cabe destacar que el grupo del Prof. Miquel Coll obtuvo una segunda estructura del complejo OBD-DNA de muy baja resolución. En esta estructura la unión se establece a través de las mismas regiones involucradas en el complejo OBD-DDR mostrado en la figura 15 y adicionalmente parece participar el lazo β 2- β 3. Aunque no se pueden determinar con rigor las interacciones, cabría la posibilidad de que este segundo tipo de complejo entre OBD y DNA correspondiera a la interacción de la proteína con la estructura cruciforme del *dso*, IR-I.

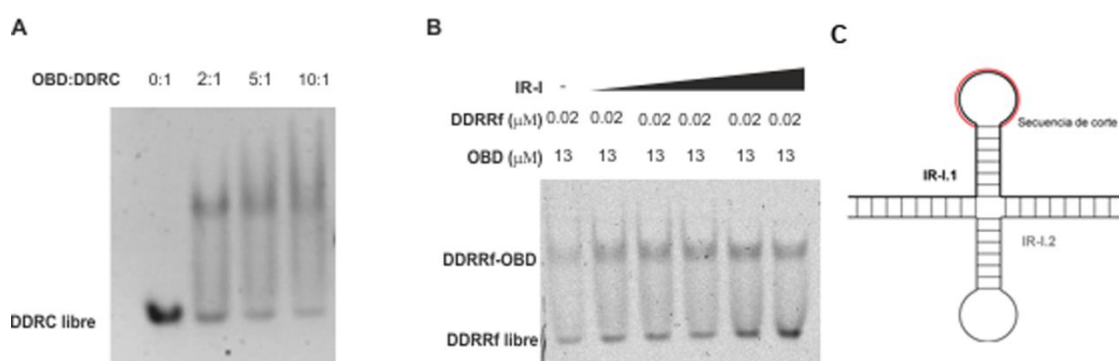


Figura 17. **Experimentos de EMSA para el análisis de la interacción de OBD con IR-I.** (A) La concentración de oligo DDRC fue 0,5 μ M y se adicionaron cantidades crecientes de proteína hasta 5 μ M. En este caso el oligo no porta fluoróforo, el DNA se tiñó con GelRed 3x y se visualizó con un transiluminador de UV. (B) En primer lugar se añadió 20 nM del oligo fluorescente DDRf a 13 μ M de OBD y a continuación concentraciones crecientes del oligo no fluorescente IR-I (2-6 μ M). Para ambos ensayos la concentración final de NaCl fue 300 mM. (C) Esquema del oligo IR-I, obtenido mediante la hibridación de los oligos monocatenarios, IR-I.1 e IR-I.2. En rojo se indica la secuencia de corte.

Por este motivo nos preguntamos si la región de RepB involucrada en la interacción con la estructura cruciforme IR-I sería diferente a la involucrada en la formación del complejo OBD-DDR (figura 15). En este contexto se llevaron a cabo ensayos de EMSA para los que se diseñó el oligo IR-I, que simulaba la estructura

cruciforme IR-I. Dicho oligo fue obtenido mediante la hibridación de los oligos monocatenarios, IR-I.1 e IR-I.2 (tabla 3), tal y como se describe en el apartado 4 de Métodos. El oligo IR-I.1 incluye una repetición invertida capaz de formar una estructura de tipo "hairpin" en cuyo lazo se sitúa la secuencia específica de corte de RepB. El oligo complementario presenta un intercambio de los dos brazos de la repetición invertida de manera que impedimos el apareamiento intercatenario por esa región y facilitamos la formación del cruciforme (figura 17C). La figura 17B corresponde a un ensayo de EMSA en el que primeramente se añadió 20 nM de DDRRf a 13 μ M de OBD y tras una incubación de 20 min se adicionaron concentraciones crecientes del oligo IR-I (2-6 μ M). En el supuesto de que OBD pudiera unirse por regiones diferentes de la proteína a los oligos DDRRf e IR-I, con este ensayo observaríamos la formación de una banda adicional correspondiente al complejo constituido por una única molécula de OBD unida a ambos oligos simultáneamente. Sin embargo únicamente se observan las bandas del complejo OBD-DDRRf y del oligo DDRRf libre. Por otro lado, el incremento de la concentración de IR-I supone la disminución del porcentaje de DDRRf que se encuentra formando el complejo OBD-DDRRf a favor de un mayor porcentaje de DDRRf libre, lo que parece reflejar cierta competición que indicaría que la región de OBD implicada en la unión a DNA es la misma para ambos oligos. En cualquier caso se trata de resultados preliminares, ya que las condiciones del ensayo no son las óptimas para un análisis de desplazamiento por competición.

Para estudiar la interacción entre OBD/RepB₆ y la estructura cruciforme IR-I se llevaron a cabo ensayos de SPR. Se diseñaron dos oligos de igual tamaño: el oligo hIR-I.1mb simula la horquilla IR-I, aunque el sitio de corte posee una mutación puntual que imposibilita el corte, mientras que el oligo monocatenario fx23mb, aparte de presentar dicha mutación, tiene modificado uno de los brazos para impedir la formación de la horquilla. Mediante análisis de unión entre OBD/RepB₆ y ambos oligos se pretendía determinar si la formación de la estructura de horquilla es relevante para la unión entre OBD/RepB₆ e IR-I.

En primer lugar nos aseguramos de que el oligo hIR-I.1mb realmente formara la estructura de horquilla por apareamiento intramolecular de bases, y no un dímero por anillamiento intermolecular. Un oligo no biotinilado y sin la ristra de Ts, hIR-I.1, que posee la secuencia de hIR-I.1mb a excepción de la mutación puntual en la secuencia específica de corte situada en el bucle, fue sometido a las condiciones de hibridación descritas en el apartado 4 de Métodos, empleando una concentración de oligo de 25 μ M. Seguidamente dicha muestra se analizó mediante electroforesis junto con el

mismo oligo no sometido a condiciones de hibridación. Ambas bandas co-migraron, pero esto no fue suficiente para revelar si el tratamiento de anillamiento daba lugar a la formación de la horquilla (figura 18C). En consecuencia, se recurrió al análisis por ultracentrifugación analítica del oligo hIR-I.1 sometido a condiciones de hibridación y el oligo control de igual longitud fx23 (tabla 3), que no fue sometido a dichas condiciones y que además no es susceptible de auto-hibridación. La masa molecular determinada fue de aproximadamente 7 kDa para ambos oligos, lo que corresponde a una única cadena, por lo que se determinó que hIR-I.1 sometido a condiciones de hibridación conformaba una horquilla y no una bicadena de 14 kDa (figura 18).

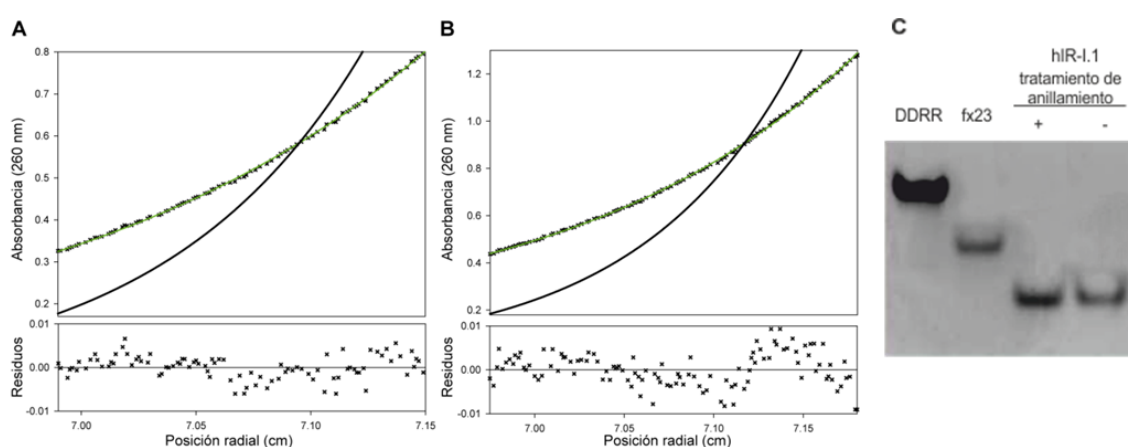


Figura 18. Experimento para determinar si el oligo hIR-I.1 presenta apareamientos inter- o intra-moleculares. El estado de oligomerización del oligo hIR-I.1 (masa molecular teórica del monómero: 6.971,5 Da) después de la reacción de hibridación se estudió mediante ultracentrifugación analítica. Como control se utilizó el oligo fx23 (masa molecular teórica del monómero: 6.880,5 Da) que, al igual que el oligo hIR-I.1, contiene la secuencia específica de corte TACTACG/AC pero sin la posibilidad de formar una estructura secundaria de tipo horquilla. En la figura se muestran los gradientes por equilibrio de sedimentación de hIR-I.1 (A) y fx23 (B) a 23.000 rpm y 20 °C; se empleó una concentración de 25 μ M de cada oligo. Las cruces negras representan los datos experimentales; la línea verde continua es el mejor ajuste M_w (hIR-1: 7336 \pm 14; fx23: 7392 \pm 12), y la línea continua negra es el ajuste teórico de un dímero de hIR-1 (13.943) o de fx23 (13.761). (C) La reacción de hibridación del oligo hIR-I.1 se analizó también mediante electroforesis junto al mismo oligo sin anillar y dos controles, el oligo bicatenario DRRR (19-mer) y el oligo monocatenario fx23 (23-mer), en un gel nativo de 20% PAA. Las bandas correspondientes a hIR-I1 co-migraron en ambas muestras. Más adelante, mediante ultracentrifugación analítica, se reveló que las dos correspondían a la estructura de horquilla.

Los resultados obtenidos por SPR correspondientes a la unión entre OBD/RepB₆ y los oligos hIR-I.1mb y fx23mb se muestran en la figura 19 y la tabla 9. En el caso de OBD observamos que la afinidad es superior cuando se forma la

horquilla, mientras que para RepB₆ la afinidad no se ve afectada por la formación de la horquilla.

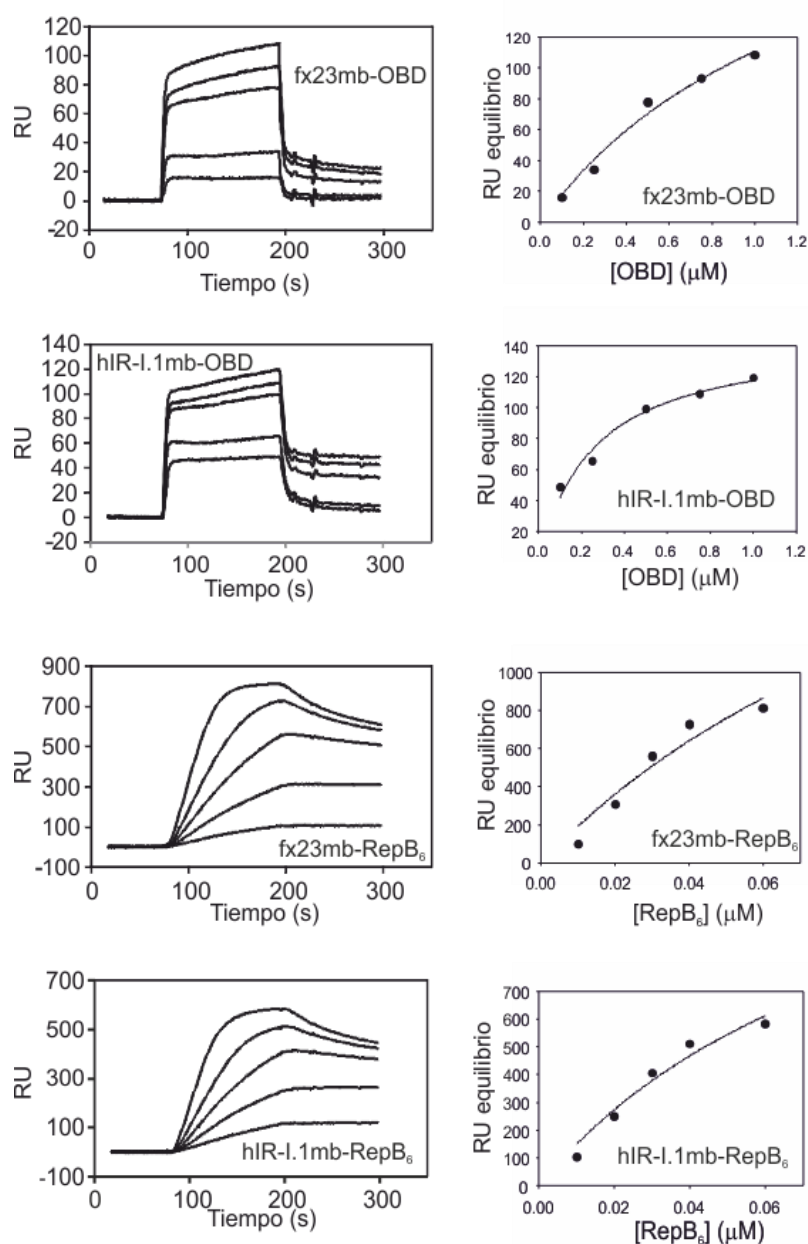


Figura 19. **Análisis por SPR de la interacción entre OBD/RepB₆ y los oligos fx23mb y hIR-I.1mb.** Las concentraciones de proteína fueron 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 μM en los ensayos de OBD, y 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 y 0,06 μM en los de RepB₆. Las proteínas fueron disueltas en tampón HBS-EP. De cada concentración se inyectó en el sistema un flujo de 10 μl/min durante 2 min. Para determinar de modo aproximado las K_d y B_{max} se representó la señal (RU) en el equilibrio para cada una de las cinco concentraciones de proteína analizadas. La afinidad de RepB₆ por ambos oligos es similar, mientras que la afinidad de OBD es mayor para hIR-I.1mb que para fx23mb.

Tabla 9. Valores aproximados de K_d y B_{max} , determinados mediante ensayos de SPR, para la interacción entre OBD/RepB₆ y los oligos fx23mb y hIR-I.1mb.

Proteína	Oligo	K_d (μ M)	B_{max}
OBD	fx23mb	1,4 \pm 0,6	260 \pm 74
OBD	hIR-I.1mb	0,25 \pm 0,06	147 \pm 11
RepB ₆	fx23mb	0,1 \pm 0,2	2859 \pm 2371
RepB ₆	hIR-I.1mb	0,1 \pm 0,06	1590 \pm 680

6. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS OBD-DDRC

Los experimentos de vida media se llevaron a cabo como se explica en el apartado 20 de Métodos. En estos experimentos se incubó OBD con el oligo fluorescente DDRCf el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de asociación/disociación y a continuación se añadió un exceso del oligo DDRC, que tiene igual secuencia que DDRCf pero no posee marcaje fluorescente. Con el transcurso del tiempo la proteína del complejo OBD-DDRCf se disocia y pasa a formar parte del complejo con el oligo no fluorescente en exceso DDRC. El seguimiento del ensayo se lleva a cabo mediante EMSA. Antes de realizar el experimento nos aseguramos estar en condiciones de competición, es decir, aquellas en las que al incubar OBD simultáneamente con los oligos DDRCf y DDRC apenas se observa la banda correspondiente al complejo OBD-DDRCf. Para determinar estas concentraciones adecuadas de ensayo se realizaron experimentos de competición en los que se añadieron simultáneamente los oligos fluorescente DDRCf y no fluorescente DDRC a diferentes concentraciones. Para 20 nM de oligo fluorescente y 960 nM de proteína fue necesaria una relación DNA no fluorescente/DNA fluorescente de 1000 veces, de modo que el complejo con el oligo fluorescente, que involucraría como máximo al 4,8% de dicho oligo, no fue apenas visible (figura 20, 2º carril).

En los experimentos de vida media se incubó la proteína con el oligo fluorescente 20 nM de DDRCf hasta alcanzar el equilibrio y a continuación se añadió el exceso de 1000 veces del oligo DDRC. Transcurridos 10 s la banda correspondiente al complejo OBD-DDRCf no se detectaba, por lo que podemos decir que la vida media es muy corta, menor de 10 s (figura 20).

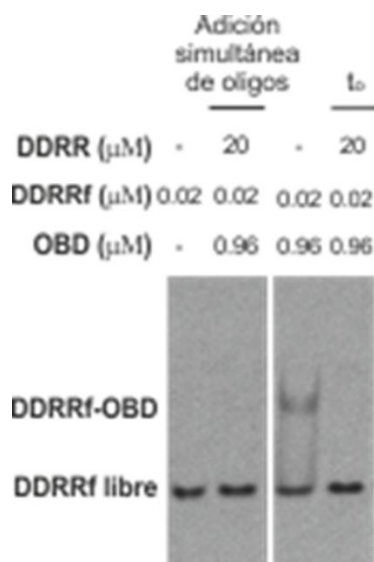


Figura 20. **Experimento de estabilidad del complejo OBD-DDRC.** Carril 2: para comprobar que las condiciones del ensayo de competición eran adecuadas se incubó 0,96 μM de OBD con una mezcla de 20 μM de DDRR y 0,02 μM de DDRRf; sólo el 4,8% del DNA fluorescente estaría acomplejado, por lo que a este porcentaje se le considera ruido de fondo. Carril 3: corresponde a la muestra tomada tras incubación 0,96 μM de OBD con 0,02 μM del oligo fluorescente DDRCf durante 20 min a 22 °C (antes de la adición del oligo no fluorescente DDRR). Carril 4: la muestra (t_0) se tomó de la mezcla inmediatamente después de la adición de 20 μM del oligo no fluorescente DDRC; en el tiempo transcurrido entre dicha adición y la introducción en el gel de electroforesis (<10 s) la proteína involucrada en la formación de complejo con DDRCf se disoció y pasó a formar complejo con DDRC.

7. ENSAYOS DE ESTEQUIOMETRÍA PARA LOS COMPLEJOS OBD-DDR Y OBD-2PDR

La detección de un único complejo en los análisis mediante EMSA de la unión entre OBD y una DDR indicaba una estequiometría de 1:1.

También quisimos determinar la estequiometría de unión entre OBD y los PDRs, ya que en los ensayos de EMSA anteriormente descritos, en los que se utilizó un oligo compuesto por una sola PDR, no se observó una banda definida para el complejo, mientras que en aquellos en los que el oligo comprendía las 2 PDRs se observó una banda de complejo predominante y otras más débiles (figura 3). Si bien no fuimos capaces de resolver la estequiometría de estos complejos de OBD con las PDRs mediante EMSA debido a que no fue posible alcanzar las condiciones experimentales necesarias, sí obtuvimos unos valores de estequiometría orientativos a partir de los experimentos de SPR descritos en el apartado 1 de este capítulo, aplicando la siguiente ecuación:

$$n = \frac{R_{\max} \cdot PM_{DNA}}{R_{DNA} \cdot PM_{proteína}}$$

Donde *n* es el número de moléculas de proteína por molécula de oligo; *R*_{DNA} es la señal en RU asociada al DNA inmovilizado en el chip sensor, que en todos los experimentos de este trabajo tiene un valor de 100 RU, y *R*_{max} es la señal otorgada por la proteína que se encuentra formando complejo cuando se alcanza la saturación.

En los ensayos de unión entre OBD y oligo DDRCb el valor de *n* es igual a 1, luego la estequiometría del complejo OBDwt:DDRCb es 1:1. Con el oligo 3DDRb el valor de *n* es igual a 3,4, lo que apunta a una estequiometría de 3:1, con cada DDR ocupada por un monómero de OBD. Por último, con el oligo 2PDRb el valor de *n* es igual a 0,8, por lo que la estequiometría podría ser 1:1. Inicialmente se creía que dos moléculas de proteína se unían a las 2PDR por tratarse de dos repeticiones, pero tanto los EMSAs (figura 10) como los experimentos de SPR parecen indicar que las dos PDRs son en realidad un único elemento de unión.

8. COOPERATIVIDAD EN LA UNIÓN DE OBD A LAS DDRs

La existencia de cooperatividad en la unión de OBD a las tres DDRs del locus *bind* podría ser relevante para explicar el modo en el que el hexámero de RepB se ensambla al unirse al origen de replicación en el inicio de la replicación plasmídica, salvo que el ensamblaje se produzca con anterioridad. Si bien es cierto que el dominio responsable de la oligomerización es OD y que dicho dominio podría ser el responsable de una cooperatividad positiva en la unión de varios protómeros de RepB a las DDRs, nos pareció oportuno determinar si la unión del dominio OBD se encuentra sometida a algún tipo de cooperatividad. Por el momento no hemos sido capaces de estudiar la cooperatividad en la unión a DNA de varios protómeros de RepB por la imposibilidad de obtener la proteína entera en forma monomérica.

Para determinar la cooperatividad se empleó el procedimiento y el análisis de datos descritos en el apartado 21 de Métodos. Se llevaron a cabo EMSAs con dos condiciones experimentales diferentes: 20 nM de 3DDRf/3DDR y concentraciones de OBD crecientes hasta 1,3 μM, y 40 nM de 3DDRf/3DDR y OBD 1,8-2,6 μM. Las muestras apropiadas para determinar la cooperatividad deben presentar los tres complejos, es decir, el DNA unido a 1, 2 o 3 moléculas de proteína, y el DNA libre

(figura 21). Se realizó el análisis de datos para todos los carriles que presentaban las cuatro bandas correspondientes; para ello se cuantificó mediante QuantityOne la fracción de cada banda y se substituyó en las siguientes fórmulas (1):

$$\theta_0 = \frac{1}{Z}$$

$$\theta_1 = \frac{(k_1 + k_2 + k_3)L}{Z} = \frac{K_1 L}{Z}$$

$$\theta_2 = \frac{(k_1 k_2 k_{12} + k_1 k_3 k_{13} + k_2 k_3 k_{23})L^2}{Z} = \frac{K_2 L^2}{Z}$$

$$\theta_3 = \frac{(k_1 k_2 k_3 (k_{12} + k_{13} + k_{23}))L^3}{Z} = \frac{K_3 L^3}{Z}$$

$$\text{donde } Z = 1 + K_1 L + K_2 L^2 + K_3 L^3$$

Siendo θ_0 la fracción de DNA libre, θ_1 la fracción de complejo 1, θ_2 la fracción de complejo 2, θ_3 la fracción de complejo 3 y L la concentración de proteína libre.

Para determinar si existe o no cooperatividad nos basamos en las siguientes premisas:

$K_2/(K_1^2/3) > 1$, implica cooperatividad entre los complejos 1 y 2

$K_3/(K_1 K_2/3) > 1$, implica cooperatividad entre los complejos 2 y 3

Resolviendo $K_2/(K_1^2/3)$ y $K_3/(K_1 K_2/3)$ para cada carril que presentaba las cuatro bandas y calculando ambas medias se obtuvo que:

$K_2/(K_1^2/3) = 2,8 \pm 1,9$. Teniendo en cuenta la desviación, no podemos concluir que haya cooperatividad positiva entre la formación del complejo 1 y el 2.

$K_3/(K_1 K_2/3) = 0,8 \pm 0,8$. No parece haber cooperatividad positiva en la formación del complejo 3 a partir del complejo 2.

Estos ensayos nos permitieron determinar la constante de asociación a un DDR (K_a).

Al tratarse de tres sitios idénticos que no mostrarían cooperatividad se cumple que:

$$k_1 = k_2 = k_3, \text{ y se denominan } K_a$$

$$k_{12} = k_{13} = k_{23} = 1$$

Sustituyendo en (1):

$$K_1 = 3k_1 = 3K_a$$

$$K_2 = 3k_1^2 = 3K_a^2$$

$$K_3 = 3k_1^3 = 3K_a^3$$

De cada pocillo se obtuvieron tres valores de K_a , uno de cada constante macroscópica, y la media de todas las constantes de todos los pocillos que presentaron las cuatro bandas fue $1,58 \pm 0,76 \mu\text{M}^{-1}$. Como se esperaba, la K_a , que es la inversa de la K_d , fue similar a la que obtuvimos en los EMSAs con oligos que contenían una sola DDR.

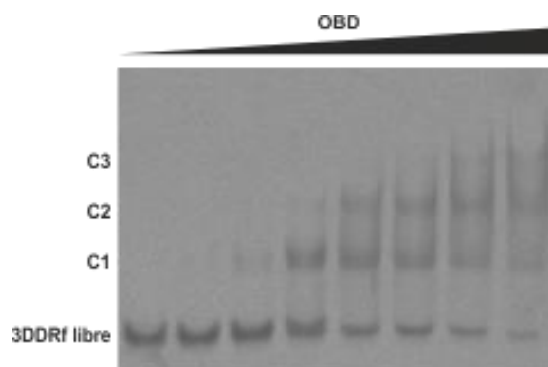


Figura 21. **Análisis de la cooperatividad de unión de OBD a las DDRs.** Se empleó 20 nM del oligo 3DDR y 2 nM de 3DDRf, el rango de concentración de OBD fue 0,10-1,14 μM . Los tres últimos carriles del gel presentaron las cuatro bandas, correspondientes a los complejos C1, C2 y C3 y al DNA libre, por lo que fueron válidos para estudiar la cooperatividad. La cuantificación de las bandas permitió calcular las fracciones de los complejos C1, C2 y C3 y el DNA libre, que fueron empleadas para el análisis de datos mediante el que se determinó que no existe cooperatividad en la formación de ninguno de los complejos.

9. INFLUENCIA DE LA DISTANCIA y LA CONSERVACIÓN DE FASE ENTRE PDRs Y DDRs EN LA REPLICACIÓN DE pMV158 EN *S. pneumoniae*.

Tanto las DDRs como las PDRs podrían participar en la formación de un hipotético macrocomplejo iniciador, y la distancia entre el locus *bind* y el sitio específico de corte, así como el mantenimiento o la pérdida de fase entre ambos loci, podrían ser aspectos relevantes en el proceso de replicación *in vivo*. Con el objetivo de conocer la influencia de la longitud del DNA situado entre PDRs y DDRs se realizaron mutaciones de inserción o deleción de 5 o 10 pb entre los dos loci del *dso* de pMV158 y se estudió la capacidad de replicación de los plásmidos mutantes en *S. pneumoniae*. El DNA adicional para las mutaciones de inserción fue introducido tras la coordenada 508 y para las mutaciones de deleción se eliminó el DNA correspondiente a las coordenadas 509-513 o 509-518 (figura 22). La metodología se encuentra descrita en el apartado 30 de Métodos, sin embargo cabe recordar que la mutagénesis no se realizó directamente en pMV158, sino que se llevó a cabo en el vector pALTER-PstI y que este fue introducido en *E. coli*; únicamente tras confirmar la existencia de la mutación correspondiente se digirió el vector modificado con PstI, así como pMV158, se aislaron los fragmentos de interés, se procedió a su ligación enzimática y finalmente se transformó *S. pneumoniae*. El hecho de que una célula bacteriana transformada con el plásmido sea capaz de formar una colonia en presencia de Tc implica que el plásmido se ha replicado y está presente en las bacterias de dicha colonia. De la secuenciación del DNA plasmídico de varias de estas colonias para cada modificación se obtuvieron los siguientes resultados: en los ensayos de deleción de 5 pb, 2 de 2 colonias de neumococos analizadas no presentaban dicha deleción en el plásmido; en el caso de los ensayos de deleción de 10 pb, 2 de 2 colonias analizadas poseían una deleción de 11 pb; para los ensayos de inserción de 5 pb, 6 de 6 colonias analizadas no presentaban modificación alguna, y para los ensayos de inserción de 9 pb se detectó 1 colonia de un total de 6 analizadas modificada por la inserción (figura 22). Estos ensayos apuntan a que es relevante la posición relativa entre DDRs y PDRs, ya que únicamente se observó replicación en los casos en los que no se modificó la fase del dsDNA. Curiosamente cuando se pretendió deleccionar 10 pb el análisis de las colonias reveló una mutación espontánea de deleción de una base adicional, quizás debido a que el número de pb por vuelta de hélice en esa región sea más cercano a 11 que a 10.

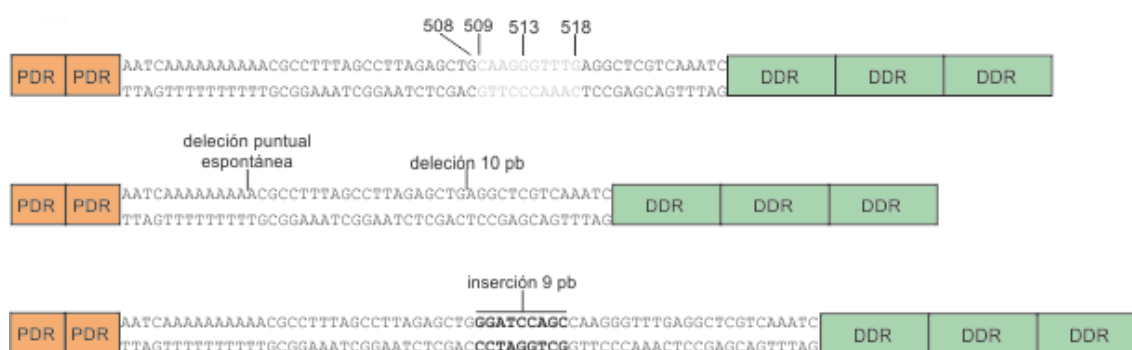


Figura 22. **Esquema de las modificaciones de distancia entre PDRs y DDRs compatibles con la replicación de pMV158.** El esquema superior muestra la secuencia sin modificar. Las mutaciones de inserción fueron introducidas tras la coordenada 508 y para las mutaciones de delección se eliminó el DNA correspondiente a las coordenadas 509-513 o 509-518 (gris). Los otros dos esquemas corresponden a las secuencias modificadas que fueron compatibles con la replicación plasmídica. Los esquemas de las secuencias modificadas que no fueron compatibles con la replicación no se muestran.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE OBD/RepB₆

La actividad enzimática de RepB, compuesta por las actividades endonucleolítica y de transferencia de cadena, posibilita la iniciación y terminación de la replicación del plásmido pMV158, por lo que su estudio es imprescindible para la comprensión del mecanismo de dicha replicación.

En esta tesis se asume como hipótesis de partida que los resultados de los ensayos de la actividad enzimática de OBD sobre oligos monocatenarios serían similares a los que resultarían para RepB. Esta asunción se apoya en el trabajo de (Boer, Ruiz-Masó et al. 2009), en el que no se observaron diferencias al comparar las actividades enzimáticas de OBD y RepB a igualdad de condiciones experimentales y empleando como sustrato un oligo portador de la secuencia de corte. Además, como queda reflejado en la tesis doctoral de Juliana Amodio la estructura cristalográfica de OBD es prácticamente idéntica a la que muestra dicho dominio en la estructura de la proteína completa (Debenjak 2014). Por tanto, las diferencias observadas en determinadas condiciones entre las actividades enzimáticas de OBD y RepB serían atribuibles fundamentalmente a que OBD muestra conformación monomérica mientras que RepB purificada presenta conformación hexamérica.

1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE OBD, CONSISTENTE EN LAS ACTIVIDADES ENDONUCLEOLÍTICA Y DE TRANSFERENCIA DE CADENA

Se realizaron dos tipos de experimentos, descritos en detalle en el apartado 22 de Métodos, para determinar la actividad enzimática del dominio OBD. La primera aproximación experimental, en la que el único sustrato añadido es el oligo que porta la secuencia de corte, no permite detectar la actividad de transferencia de cadena por la cual, tras el corte específico de secuencia del oligo sustrato, RepB reconstituye dicho oligo catalizando la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' del producto al que ha quedado covalentemente unida y el extremo 3'-OH libre del otro producto. Los resultados obtenidos de este modo sugerían una eficiencia enzimática pobre, que distaba mucho de la real. Se observó que, aparentemente, bajo condiciones de 130 mM de NaCl, 2 mM de Mn²⁺, 0,15 µM de OBD, 0,5 µM del oligo sustrato fx23 y una incubación de 10 min a 37 °C, únicamente el 34% de las moléculas de oligo fueron cortadas (carril central de la figura 23A). Para solventar esta distorsión de los resultados se realizó el segundo tipo de experimento, en el que, además de añadir el oligo sustrato portador de la secuencia de corte, se añadió, en un exceso de

10 veces respecto a éste, otro oligo monocatenario que proporcionaba el sustrato 3'-OH requerido para la reacción de transferencia de cadena. Con esta estrategia conseguimos desplazar prácticamente la totalidad de la reacción de transferencia de cadena hacia el oligo que se proporciona en exceso y así evitamos la reconstitución del oligo sustrato inicial. Como la longitud del oligo añadido en exceso reportaba al producto de transferencia de cadena una longitud inferior a la del oligo sustrato, se pudo determinar mediante electroforesis la cantidad real de moléculas de oligo sustrato cortado y, en consecuencia, la eficacia enzimática real. De este modo se observó que el 98% de las moléculas del oligo sustrato fx23 fueron cortadas (último carril de la figura 23A).

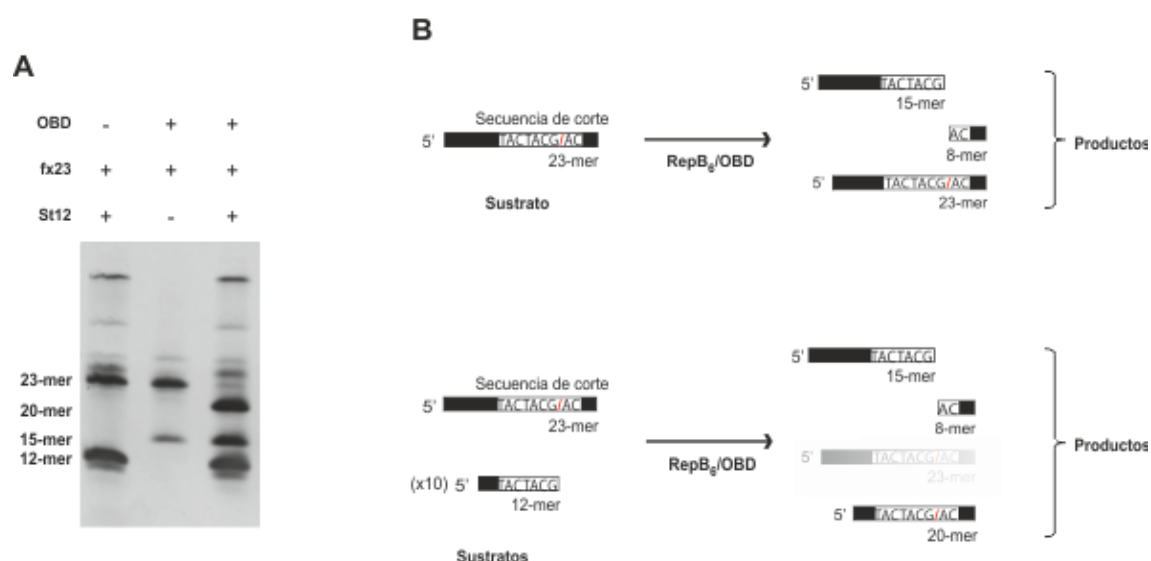


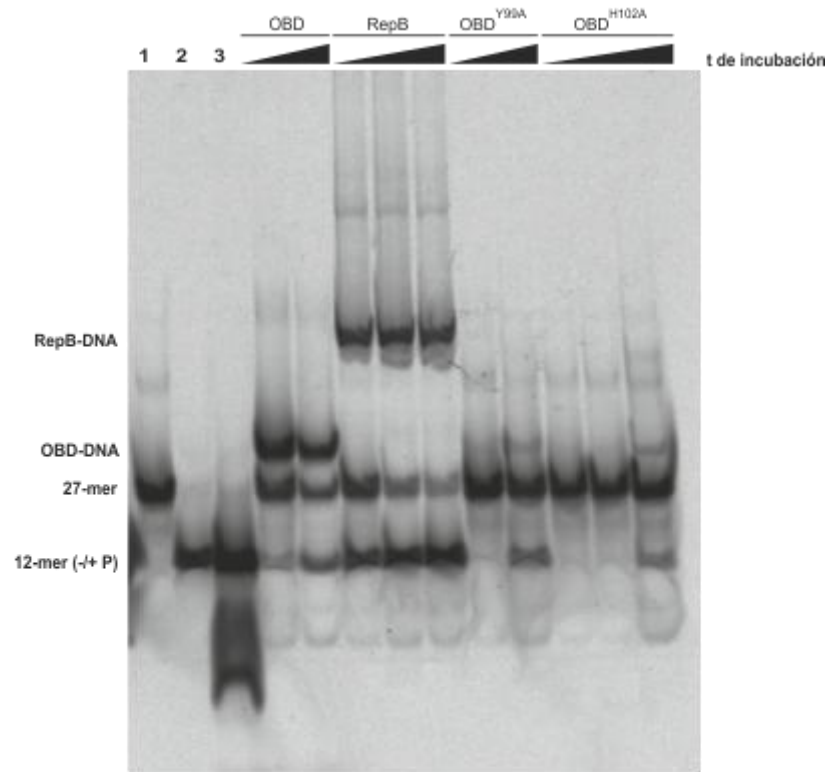
Figura 23. **Análisis de las actividades endonucleolítica y de transferencia de cadena de OBD/RepB.** (A) La muestra correspondiente al primer pocillo contenía 0,5 μ M del oligo sustrato fx23 (23-mer) y 5 μ M del oligo ST12 (12-mer), en ausencia de enzima. Para el segundo carril la mezcla de reacción fue 2 mM de Mn^{2+} , 130 mM de NaCl, 0,15 μ M de OBD y 0,5 μ M del oligo sustrato fx23 portador de la secuencia de corte; la incubación fue a 37 °C durante 10 min. Únicamente el 34% de las moléculas de oligo fueron aparentemente cortadas. En el tercer carril, la mezcla de reacción contuvo, además, un exceso de 10 veces del oligo ST12, por lo que se pudo diferenciar el producto resultante de la actividad de transferencia de cadena (20-mer) y en consecuencia la cantidad de moléculas de fx23 cortadas realmente (98%). (B) Esquema de sustratos y productos para los dos tipos de experimentos. En el esquema de reacción de la segunda aproximación experimental el producto 23-mer se representa con transparencia porque la cantidad de este producto es muy reducida, ya que la reacción de transferencia de cadena sucede mayoritariamente con el sustrato 12-mer que se encuentra en exceso.

2. DETECCIÓN DE LOS ADUCTOS COVALENTES OBD-DNA Y RepB-DNA

Las proteínas con actividad topoisomerasa, como es el caso de RepB, al igual que las recombinasas y relaxasas, suelen usar los residuos nucleofílicos Y para llevar a cabo las reacciones de transferencia de cadena de DNA. Estas reacciones son isoenergéticas, es decir, la energía del enlace fosfodiéster cortado se conserva en forma de enlace fosfotirosina, lo que permite la subsecuente re-ligación en una etapa posterior. De hecho, en el mecanismo de replicación de pMV158 se postula la formación de un enlace covalente entre la tirosina iniciadora y el extremo 5'-P de la cadena cortada, cuya permanencia durante el proceso de síntesis de la cadena líder es necesaria en la etapa de terminación para que se produzca la reacción de transferencia de cadena que genera el intermedio circular de ssDNA constituido por la cadena parental desplazada (figura 3). Sin embargo, los ensayos diseñados para detectar y caracterizar el aducto covalente de RepB, realizados con anterioridad a este trabajo, únicamente permitieron sugerir que dicha unión covalente debía de ser muy inestable, un resultado similar al obtenido con la proteína gpII, responsable de la iniciación de la replicación del colifago fd (Moscoso, del Solar et al. 1995, Moscoso, Eritja et al. 1997). Durante el desarrollo de este trabajo de tesis hemos sido capaces de detectar, finalmente, el aducto covalente de OBD o RepB con el DNA. A continuación se describe el procedimiento que lo hizo posible. Normalmente se empleó 0,2 μ M de oligo y la concentración de proteína varió entre 0,15 y 4 μ M; la reacción se llevó a cabo en tampón B suplementado con 2 mM de Mn^{2+} y 130 mM de NaCl. Las muestras se incubaron a 37 °C durante un tiempo que varió entre 15 s y 30 min, y para detener la reacción se empleó 0,1% de SDS, añadido junto a la solución de carga BXGE. Para la detección del aducto se recurrió al marcaje fluorescente del extremo 3' del oligo sustrato; también se trató de detectarlo por tinción de proteínas con SYPRO Ruby, pero la sensibilidad no fue suficiente. Puesto que la fluorescencia del oligo fue el modo de detección del aducto, se utilizó un exceso de proteína, pretendiendo así incrementar el porcentaje de oligo implicado en la formación de aducto covalente. Para comprobar la fiabilidad de los ensayos se confirmó tanto que la proteína no presentaba fluorescencia inherente a las longitudes de onda de excitación y emisión del fluoróforo, como que la diferencia de movilidad entre la banda del oligo 12-mer control y la atribuida al complejo entre la proteína y el oligo 12-mer producto se debía realmente a la formación de dicho complejo y no al grupo fosfato 5' adicional resultante del corte. Para confirmar este último punto se fosforiló el oligo 12-mer control y se comparó con ese mismo oligo sin fosforilar mediante electroforesis en un gel desnaturalizante. El

oligo fosforilado migró a la par que el oligo 12-mer resultante del corte enzimático y de manera muy similar al oligo 12-mer control, por lo que se confirmó que la banda atribuida al aducto no era consecuencia del grupo fosfato adicional (figura 24A). A la hora de analizar las diferentes condiciones experimentales, se emplearon geles de 7,2 cm de longitud de PAA 20% y urea 8 M sin SDS, en los que únicamente se vieron los oligos producto resultantes de la reacción. Sin embargo, cuando se pretendió detectar el aducto covalente, normalmente se emplearon geles de 22 cm de longitud que contenían PAA 10% y SDS 0,3%, con TBE suplementado con SDS 0,3% como tampón de electroforesis. La adición de SDS es clave, ya que mantiene la proteína desplegada y con una carga neta negativa, posibilitando la migración del aducto covalente en la matriz del gel. De este modo se observó la formación de complejo covalente proteína-DNA tanto con RepB como con OBD y, en menor medida, con las formas mutantes OBD^{Y99A} y OBD^{H102A} (figura 24).

A



B

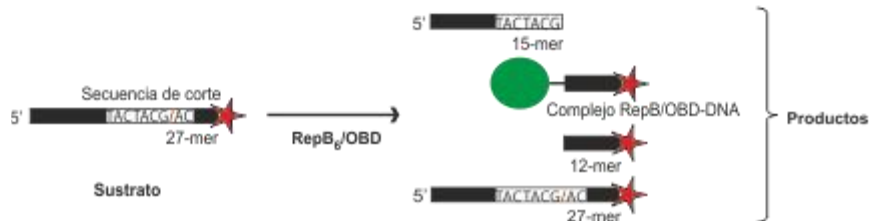


Figura 24. **Detección del aducto covalente OBD-DNA y RepB-DNA.** (A) La electroforesis se llevó a cabo a 220 V en un gel de PAA 10% y SDS 0,3%; el tampón de electroforesis fue TBE suplementado con SDS 0,3%. Los primeros carriles corresponden a los siguientes controles: 1) oligo fx23+4f3' (27-mer), 2) oligo fx8+4f3' (12-mer), y 3) oligo fx8+4f3' fosforilado en 5'. A continuación se encuentran los carriles de las muestras en las que 0,2 μ M del oligo sustrato fx23+4f3' (27-mer) se incubó a 37 °C durante intervalos de tiempo crecientes con 4 μ M de cada una de las proteínas indicadas, en una mezcla de reacción de 20 μ l de volumen final que contenía 2 mM de Mn^{2+} y 130 mM de NaCl. Los tiempos de incubación fueron 15 s y 15 min para OBD; 15 s, 5 min y 10 min para RepB; 15 s y 30 min para OBD^{Y99A}, y 15 s, 1 min y 30 min para OBD^{H102A}. Se observa el complejo covalente formado tanto por RepB como por OBD y sus formas mutantes, OBD^{Y99A} y OBD^{H102A}. (B) Esquema de los sustratos y productos correspondientes a este tipo de experimento. La estrella roja hace referencia al marcaje fluorescente, mientras que el círculo en verde representa la proteína.

A continuación quisimos confirmar la presencia tanto de OBD como de RepB en el complejo covalente mediante *Western Blot* (figura 25). Como ya se ha mostrado en la figura 24, el mutante con la Y catalítica sustituida por A, OBD^{Y99A}, conserva ciertos niveles de actividad enzimática y capacidad para formar un complejo covalente, un hecho que vuelve a ponerse de manifiesto en los experimentos de *Western Blot*. En consecuencia, debe existir un segundo residuo catalítico capaz de generar un aducto covalente con DNA (figuras 24 y 25). Los resultados referentes a la identificación de este residuo catalítico quedan recogidos en el apartado 4 de este capítulo.

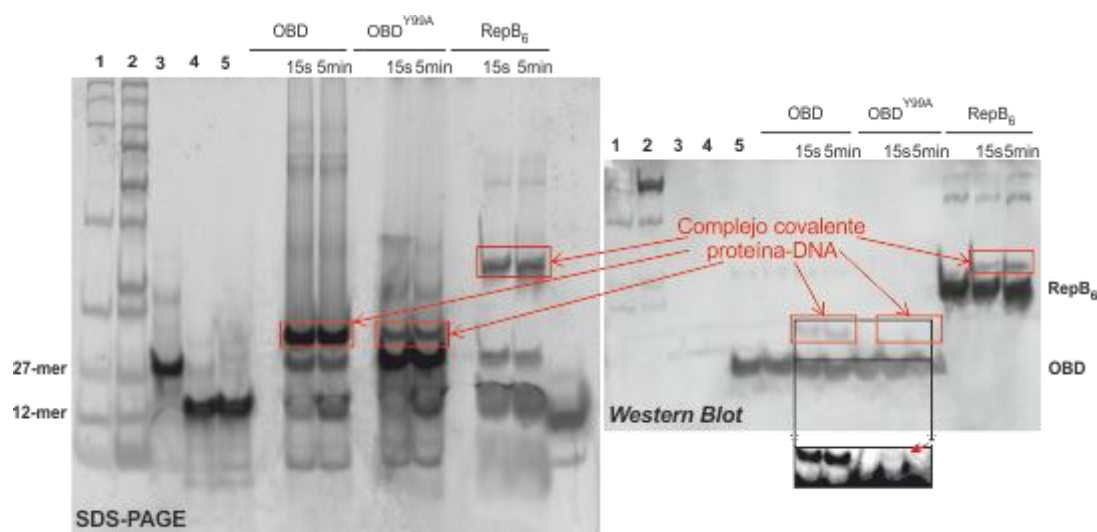


Figura 25. **Detección del complejo covalente formado entre OBD/OBD^{Y99A}/RepB y DNA mediante *Western Blot*.** El esquema de la reacción subyacente se muestra en la figura 24B. A la izquierda se encuentra el análisis de las especies que contienen DNA fluorescente mediante electroforesis en geles de PAA 10% y SDS 0,3%. Las especies que se visualizan, por estar marcados con el fluoróforo, son el oligo 27-mer, el aducto covalente y el fragmento de DNA resultante de la hidrólisis del aducto. Los primeros carriles corresponden a los siguientes controles: 1) y 2) marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* y *Precision Plus Protein Western C Standards*, respectivamente, 3) el oligo fx23+4f3' (27-mer), 4) el oligo fx8+4f3' (12-mer), y 5) el oligo fx8+4f3' (12-mer) incubado con OBD. Los carriles que siguen corresponden a las muestras en las que el oligo sustrato fx23+4f3' se incubó con cada una de las proteínas indicadas, a excepción de los primeros carriles para cada proteína, que corresponden a controles que contienen proteína pero no oligo. La reacción se llevó a cabo en tampón B suplementado con 2 mM de Mn²⁺ y 130 mM de NaCl; con el objetivo de mejorar la definición de las bandas se redujo el volumen de reacción hasta 14 µl. Para las reacciones con OBD y OBD^{Y99A} se emplearon 57 µM y 114 µM de proteína, respectivamente, y 2,9 µM de oligo sustrato, mientras que cuando se trató de RepB se emplearon 3,6 µM de proteína y 1,4 µM de oligo. A la derecha se muestra el análisis por *Western Blot*, llevado a cabo tal y como se describe en el apartado 23 de Métodos, a partir del gel de electroforesis de la izquierda. Se observa la presencia de proteína en el complejo covalente con DNA en los tres casos analizados.

Con el objetivo de poner a punto un método de detección del complejo covalente empleando geles de menores dimensiones, se probaron geles de 8, 10, 12, 15 ó 20% de PAA, 6 M de urea y 0,3% de SDS, con o sin gel concentrador de PAA al 5% y con tampón de electroforesis TBE suplementado con 0,3% de SDS. De este modo se visualizó el complejo, pero las bandas eran muy difusas. La siguiente aproximación consistió en añadir, tras el tiempo de reacción y con anterioridad a la solución de carga BXGE, 0,1% de SDS y 125 µg/ml de proteinasa K e incubar 15 min a 37 °C para que se produjera la digestión proteica. De este modo se consiguió que la banda correspondiente al complejo covalente no contuviera la proteína entera, sino un pequeño péptido (figura 26). La adición de 0,1% de SDS en la mezcla de reacción, además de detener la actividad enzimática de RepB, favorece la actividad proteolítica de la proteinasa K. Finalmente, esta estrategia resultó exitosa tanto para OBD como para RepB, por lo que en todos los ensayos posteriores en los se pretendió visualizar el aducto se realizó este tipo de ensayo. Pese a que el efecto del catión Mn^{2+} en la actividad enzimática de RepB se trata más adelante (apartado 5), cabe mencionar que en la figura 26 se observa que al aumentar la concentración de catión Mn^{2+} de 1 µM a 1 mM el nivel de actividad enzimática de RepB₆ aumenta notablemente y se iguala al observado para OBD, el cual muestra el mismo nivel de actividad enzimática tanto a 1 µM como a 1 mM.

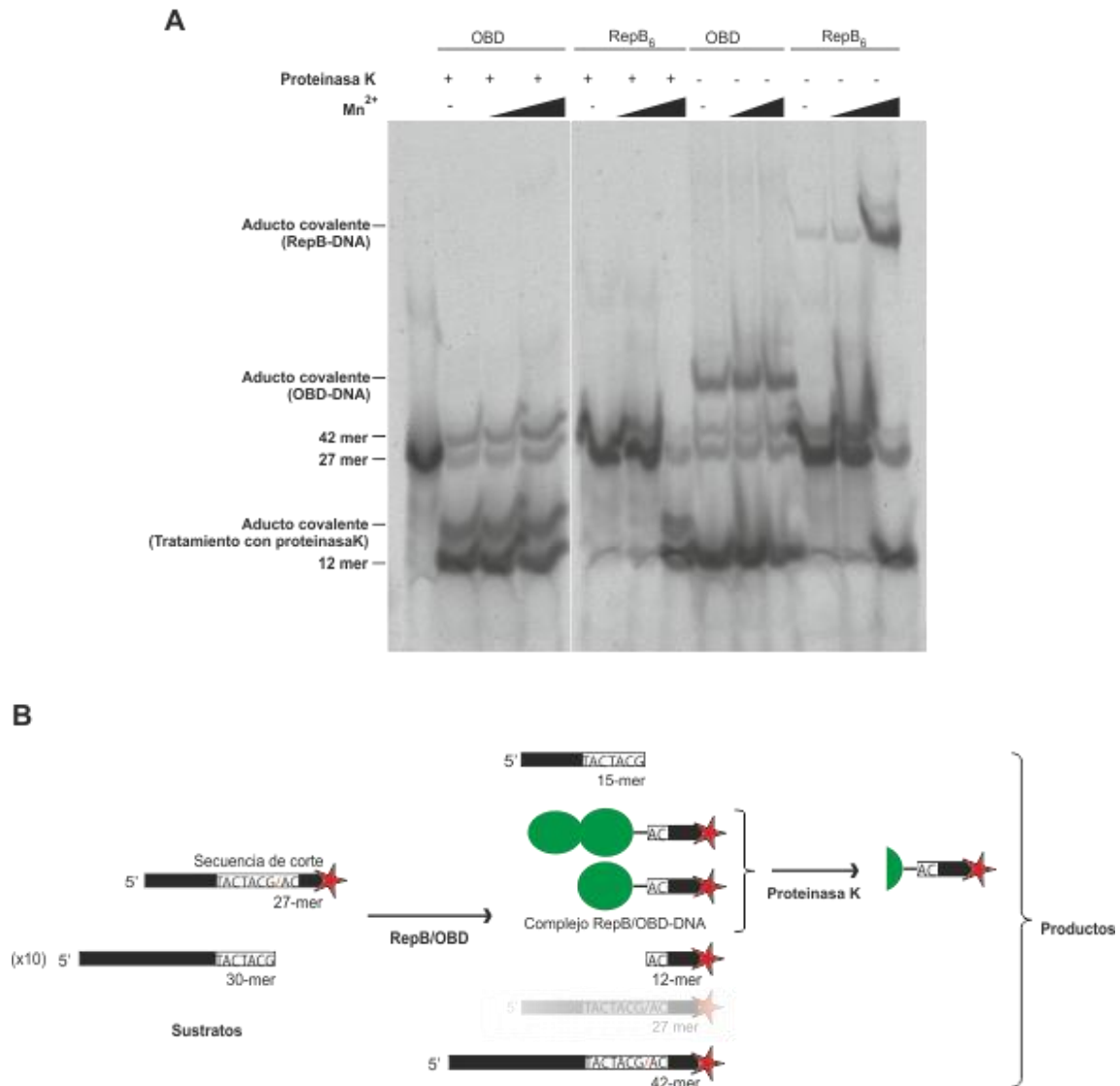


Figura 26. **Detección del complejo covalente sometido a tratamiento con proteinasa K.** (A) Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de 10% PAA y 0,3% SDS. Las mezclas de reacción contenían 2 μ M del oligo fx23+4f3' (27-mer), 20 μ M del oligo ST30 (30-mer) y 40 μ M de cada una de las proteínas; en caso de añadir Mn²⁺, las concentraciones fueron 1 μ M o 1 mM. Transcurridos 5 min de incubación a 37 °C, se detuvo la reacción con 0,1% de SDS y una concentración final de 125 μ g/ml de proteinasa K. (B) Esquema de los sustratos y productos correspondientes a este tipo de experimento. La estrella roja hace referencia al marcaje fluorescente, mientras que en verde se representa la proteína. El producto 27-mer se representa con transparencia porque la cantidad de este producto es muy reducida ya que la reacción de transferencia de cadena sucede mayoritariamente con el sustrato 30-mer que se encuentra en exceso.

3. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DEL ADUCTO COVALENTE OBD-DNA

Tras la detección del aducto covalente se pensó que resultaría interesante purificar dicho aducto para completar su caracterización e intentar determinar su estructura cristalina. La purificación no se ha llevado a cabo todavía; no obstante se han determinado algunas condiciones favorables para la formación de aducto covalente o desfavorables para la formación del producto 12-mer resultante de la hidrólisis del aducto, que podrían resultar útiles para la purificación del mismo. Dichas condiciones quedan recogidas en este apartado. Todos los ensayos descritos a continuación se han llevado a cabo con 40 μ M de OBD, 10 μ M del oligo sustrato fx23+4f3', una concentración final de 300 mM de NaCl y en presencia de 0,2 mg/ml de BSA.

La estabilidad del aducto covalente viene dada, en gran medida, por su grado de hidrólisis. En la figura 27A se observa que a tiempos cortos de reacción hay un mayor predominio del aducto covalente y una menor proporción del producto 12-mer en comparación con lo sucedido a tiempos de reacción más largos. Un tiempo de reacción de 30 s resultaría conveniente para la purificación del aducto.

Para determinar la influencia de la temperatura en la estabilidad del aducto covalente, tras un tiempo de reacción de 30 s a una temperatura de 22 °C, parte de la mezcla se incubó a 0 °C, mientras que otra parte continuó a 22 °C. Se observó que la relación de aducto covalente/producto 12-mer es mayor a 0 °C, de lo que se desprende que temperaturas bajas reducen considerablemente la hidrólisis del aducto covalente (figura 27A).

En el caso de que el catión metálico del centro activo estuviera involucrado en la hidrólisis del aducto, el EDTA podría quelar dicho catión y reducir el grado de hidrólisis. Para estudiar el efecto del EDTA sobre la hidrólisis del aducto covalente, transcurridos 30 s de reacción se adicionó 20 mM de EDTA y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Se observó que el EDTA anula la actividad endonucleasa de la enzima, pero no estabiliza el aducto covalente (figura 27B).

Ya que la hidrólisis del aducto covalente se llevaría a cabo mediante el ataque nucleofílico del ion hidroxilo de una molécula de agua, creímos interesante analizar la influencia del pH en dicha hidrólisis. Tras 30 s de reacción se añadió HCl hasta reducir

el pH de 8,0 a 4,5. De este modo se mejoró la estabilidad del aducto covalente sin anular la actividad endonucleolítica de la proteína, tal y como muestra la progresiva disminución del DNA sustrato a lo largo del tiempo en condiciones de pH ácido (figura 27C).

Finalmente se analizó el efecto de la tiourea, que actúa como secuestrador de grupos OH. Transcurridos 30 s de reacción, la mezcla se suplementó con 41 mM de tiourea, pero no se apreció ninguna mejoría en la estabilidad del aducto (figura 27D).

Ha sido posible obtener un valor aproximado de la vida media del aducto covalente OBD-DNA bajo algunas de las condiciones que se acaban de describir. Para ello se ha determinado la disminución de la proporción de la banda correspondiente al aducto covalente a lo largo del tiempo (figura 27) cuando ya únicamente se observaba conversión de aducto en producto 12-mer, sin que se apreciaran variaciones significativas en la proporción del sustrato. La ecuación empleada para el análisis de datos fue la siguiente:

$$\log \frac{A}{A_0} = -\frac{\log 2}{t_{1/2}} t$$

A es la cantidad de aducto OBD-DNA en un tiempo dado, t, y A₀ su valor en el momento t=0.

De la anterior ecuación se dedujo la vida media, t_{1/2}. La t_{1/2} obtenida para 37 °C fue 13±3 min, mientras que para 22 °C fue 94±10 min y para 0 °C aumentó hasta 314±69 min. La disminución del pH también supuso un aumento de t_{1/2}, siendo esta 169±16 min para pH 4,5 y una temperatura de 22 °C.

Resumiendo, la estabilidad del aducto covalente OBD-DNA, y en consecuencia la proporción del mismo, se verían incrementadas si la reacción enzimática se llevara a cabo durante 30 s y a continuación, durante todo el proceso de purificación y en la medida de lo posible, se mantuviera una temperatura de 0 °C y un pH de 4,5.

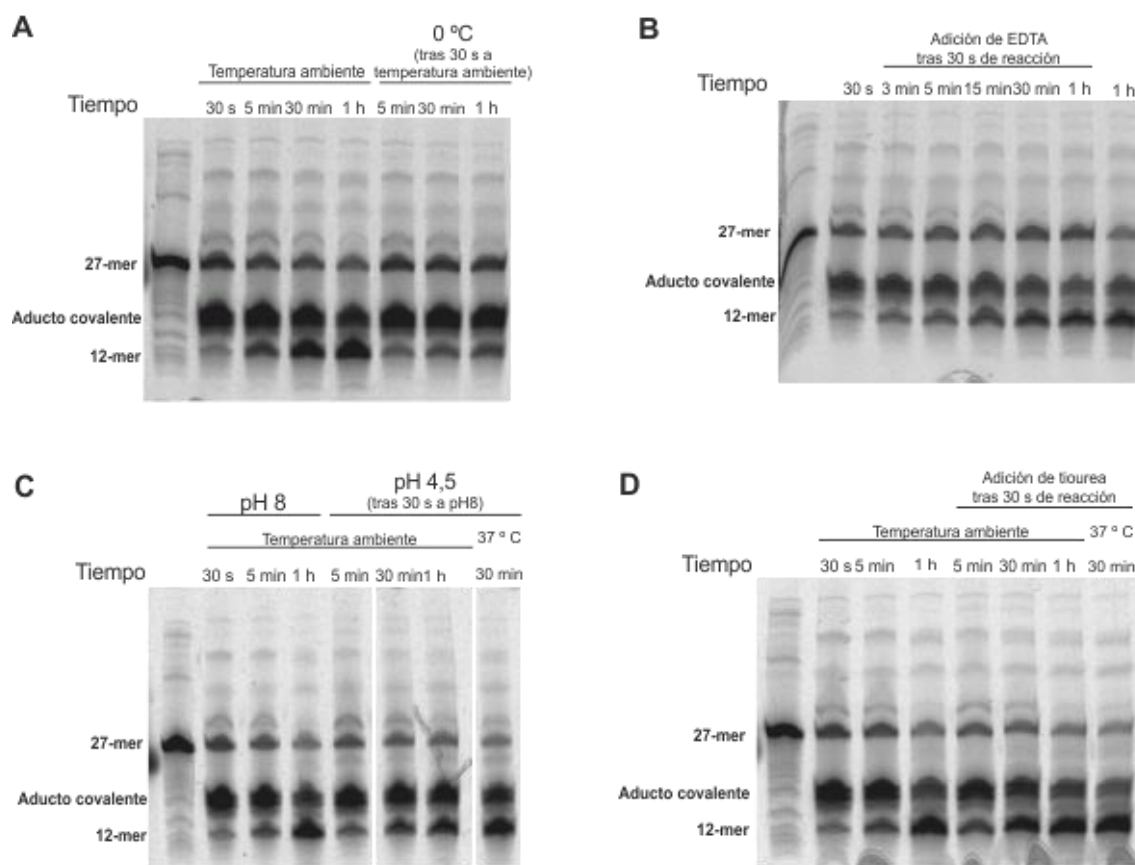


Figura 27. **Estabilización del aducto covalente OBD-DNA.** En los cuatro ensayos se empleó 40 μ M de OBD, 10 μ M del oligo sustrato fx23+4f3' (27-mer), NaCl 300 mM, 1 mM de Mn^{2+} y 0,2 mg/ml de BSA. En el primer pocillo no se adicionó OBD. (A) La reacción transcurrió durante 30 s a 22 °C y a continuación parte de la mezcla se enfrió en un baño de hielo, mientras que la otra parte continuó a 22 °C. Tanto de la muestra a 22 °C como de la mantenida a 0 °C se tomaron alícuotas a 5 min, 30 min y 1 h. (B) La reacción transcurrió durante 30 s a 22 °C y a continuación parte de la mezcla se suplementó con 20 mM de EDTA. De la muestra con EDTA se tomaron alícuotas a 3 min, 5 min, 15 min, 30 min y 1 h, y en el caso de la muestra sin EDTA se analizó una alícuota tras 1 h. (C) La mezcla de reacción se mantuvo durante 30 s a pH 8 y a continuación a parte de la mezcla se le añadió HCl 0,5 N hasta reducir su pH a 4,5. De la mezcla a pH 8 se tomaron alícuotas a 30 s, 5 min y 1 h, mientras que de la mezcla a pH 4,5 se tomaron alícuotas a 5 min, 30 min y 1 h. Las reacciones transcurrieron a una temperatura de 22 °C, aunque una alícuota de la mezcla de reacción a pH 4,5 se incubó a 37 °C durante 30 min (último pocillo). (D) La reacción transcurrió durante 30 s a 22 °C y a continuación parte de la mezcla se suplementó con 41 mM de tiourea. De la muestra con tiourea se tomaron alícuotas a 5 min, 30 min y 1 h, y en el caso de la muestra sin tiourea se tomaron alícuotas a 5 min y 30 min. Las reacciones transcurrieron a una temperatura de 22 °C, aunque una alícuota de la mezcla de reacción con tiourea se incubó a 37 °C durante 30 min (último pocillo).

4. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE OBD Y FORMAS MUTANTES CON MODIFICACIONES EN EL CENTRO ACTIVO: BÚSQUEDA DEL SEGUNDO RESIDUO CATALÍTICO

Para conocer qué residuos del centro activo de RepB están implicados en la actividad enzimática y de qué modo, se generó una batería de mutantes de OBD con algunos de los residuos del centro activo sustituidos por A. La elección de estos residuos se fundamentó tanto en su naturaleza y posición en la estructura de la proteína, como en su equivalencia con residuos localizados en el centro activo de otras endonucleasas HUH.

En cuanto al análisis de la actividad enzimática, como se ha mostrado en los apartados 2 y 3 de este capítulo, hemos sido capaces de detectar simultáneamente los productos derivados de las actividades endonucleasa y de transferencia de cadena, lo que nos ha permitido obtener información no solo de la actividad global de OBD y sus formas mutantes, sino también de qué reacciones se han visto más comprometidas en cada mutante. Esta información nos ha reportado algunas pistas para la comprensión del mecanismo molecular de la iniciación de la replicación del plásmido pMV158. Para estudiar la reacción enzimática, tanto en el caso de OBD como de sus formas mutantes, se realizaron dos tipos de experimentos que se analizaron en geles de PAA al 20% suplementados con 6 M de urea. En los ensayos en los que se pretendió detectar con claridad las bandas correspondientes al oligo sustrato 27-mer, al aducto covalente, al producto 12-mer de hidrólisis del aducto y al oligo 42-mer resultante de la transferencia de cadena entre el producto de corte 12-mer y el oligo ST30, se empleó 2,5 μM de proteína, 0,5 μM del oligo sustrato fx23+4f3', 5 μM del oligo ST30, 7,5 μM o 1 mM de Mn^{2+} y 300 mM de NaCl; la incubación se llevó a cabo durante 5 min a 37 °C. En la figura 28A se observan las variaciones en el patrón de bandas entre los diferentes mutantes bajo dichas condiciones, siendo la concentración de Mn^{2+} 7,5 μM . Si bien únicamente se muestra un gel, se realizaron varias repeticiones de estos ensayos. En el segundo tipo de experimentos se pretendió detectar diferencias en los niveles de actividad catalítica global entre los diferentes mutantes, para lo que se emplearon condiciones de exceso de oligo sustrato respecto a proteína, concretamente 25 nM de proteína y 250 nM del oligo sustrato fx23+4f3', 2,5 μM del oligo ST30, 2 mM de Mn^{2+} , 130 o 300 mM de NaCl, y la incubación se llevó a cabo durante 2 min, 5 min o 30 min a 37 °C. El efecto de las mutaciones sobre la actividad enzimática de las variantes de OBD se observó a los tres tiempos, por lo que

únicamente se muestran los resultados correspondientes a 30 min (figuras 28B y 29, y tabla 11). Los resultados obtenidos mediante ambos tipos de experimentos para las formas de OBD mutantes en el centro activo se describen a continuación y quedan también recogidos en la figuras 28 y 29, así como en las tablas 10 y 11.

Como se ha comentado anteriormente, la sustitución del residuo Y99, hasta este trabajo considerado el único residuo catalítico de RepB, no abolía por completo la actividad catalítica y no impedía la formación de un complejo covalente. En consecuencia, construimos una serie de mutantes dobles en los que el cambio Y99A se combinó con sustituciones, también por A, en los residuos Y115, Y14, Y8 o H102, que por su localización en la estructura cristalina de la proteína (figura 6) fueron considerados candidatos a segundo residuo catalítico. Para completar el análisis, adicionalmente se construyeron mutantes individuales para dichos residuos. Como se observa en la figura 28A, H102 podría ser el segundo residuo catalítico, ya que el doble mutante OBD^{Y99H102A} es el único que pierde totalmente la actividad enzimática. Tras este resultado consideramos interesante averiguar si la función de Y99 podía ser sustituida por un residuo de H y, simultáneamente, la función de H102 sustituida por un residuo de Y. Para ello construimos el doble mutante OBD^{Y99HH102Y} con el que observamos que la actividad catalítica se recupera mínimamente respecto a la variante OBD^{Y99H102A} (figura 28A). En los ensayos correspondientes a la figura 28A, en los que se busca analizar las cuatro especies detectables de la reacción enzimática anteriormente descritas, tanto OBD^{Y99A} como OBD^{H102A} presentan un claro predominio del producto 42-mer de transferencia de cadena (77% y 71%, respectivamente, de los productos de reacción; tabla 10) que no se da en el caso de OBD. Sin embargo, mientras que para el mutante OBD^{Y99A} parece haber el mismo porcentaje de oligo 12-mer que de aducto, para OBD^{H102A} el porcentaje de aducto es algo superior al de oligo 12-mer, un hecho que podría reflejar una mayor estabilidad del aducto formado con Y99 respecto al formado con H102. La información anterior nos llevó a establecer la hipótesis según la cual Y99 podría ser el residuo responsable del corte endonucleolítico que inicia la replicación de la cadena líder, mientras que H102 lo sería del corte endonucleolítico que sucede en la terminación de la replicación de dicha cadena, ya que la estabilidad del aducto se requeriría durante la etapa de elongación de la replicación de la cadena líder. Respecto al candidato Y8, no parece tener un papel relevante, ya que su sustitución por A no implica variaciones ni en el patrón de bandas ni en la actividad enzimática global. Sin embargo, la sustitución de Y14 por A disminuye la actividad enzimática global y el patrón de bandas generado por el mutante parece mostrar cierto predominio del producto de transferencia de cadena

(figura 28 y tablas 10 y 11). Si bien Y14 no parece ser el segundo residuo catalítico, ya que OBD^{Y99Y14A} conserva en parte su actividad enzimática, debe tener un papel importante en la reacción catalítica, probablemente determinando una arquitectura adecuada, por ejemplo, para el paso del DNA sustrato, lo que sería compatible con la posición que ocupa en el centro activo (figura 6). El residuo Y115, debido a su orientación en el centro activo y a que OBD^{Y99Y115A} conserva en parte su actividad enzimática, tampoco parece ser el segundo residuo catalítico, pero su sustitución afecta a la actividad total y al perfil de bandas (figura 28 y tablas 10 y 11).

Nuestra hipótesis sobre la función de Y115 en la catálisis, una vez descartada su participación como residuo catalítico, fue que podría tener un doble papel sobre el residuo D42: por una parte participaría en la orientación de D42 respecto al catión del centro activo y por otra modularía su carga a través de un puente de hidrógeno, previniendo así parcialmente la neutralización del metal y la subsecuente baja polarización del enlace fosfodiéster. Como se observa en las figuras 28 y 29, el mutante OBD^{D42A}, aunque muestra una afinidad disminuida por Mn²⁺ (véase el apartado 5 de este capítulo), no presenta una actividad enzimática afectada en condiciones de saturación del centro activo por el metal, mientras que dicha actividad sí está mermada en OBD^{Y115A} y, en menor medida, en OBD^{D42Y115A} (figuras 28B y 29). Quedaría de este modo descartada la hipótesis de un papel de Y115 al servicio exclusivo de la función de D42, ya que, de ser así, la actividad de OBD^{D42AY115A} debería ser similar a la de OBD^{D42A}, pues una vez sustituido D42 la función de Y115 sería irrelevante. Por tanto, la sustitución de Y115, además de involucrar a D42, debe tener otras consecuencias en la configuración del centro activo. En la figura 28A y en la tabla 10 se observa que el patrón de productos de OBD^{Y115A} presenta un predominio de las bandas correspondientes al producto 42-mer y al aducto (38% y 50%, respectivamente, de los productos de reacción; tabla 10) respecto a la del producto 12-mer (12% de los productos de reacción), que contrasta con lo observado para OBD (24% del producto 42-mer, 40% del aducto y 36% del producto 12-mer). Esto podría deberse a una reducción de la hidrólisis del aducto, lo que justificaría que, además de acumularse más aducto, también se acumule más oligo de 42-mer, ya que habría más moléculas de aducto para llevar a cabo la transferencia de cadena. En consecuencia, Y115 podría tener un papel adicional relevante, aunque indirecto, en la reacción enzimática global, mediando quizás en la hidrólisis del aducto. Como ya se ha mencionado, la estructura cristalina de OBD revela la presencia de un puente de hidrógeno entre Y115 y D42 (figura 6). Por tanto, D42 podría contribuir a la desprotonación del grupo OH de Y115, lo que a su vez promovería la desprotonación

de una molécula de agua que actuaría como nucleófilo sobre el enlace covalente formado entre el residuo catalítico y el DNA. Para OBD^{D42A} un 36% de los productos de reacción corresponde al producto de transferencia de cadena 42-mer, un porcentaje superior al 24% observado en el caso de OBD; además OBD^{D42A} muestra un ligero decremento del grado de hidrólisis del aducto en comparación con OBD. Cuando a la sustitución de D42 se le suma la de Y115, en el mutante OBD^{D42Y115A}, el patrón de bandas se asemeja al de OBD^{Y115A}: un 39% de los productos de reacción corresponde al producto de transferencia de cadena 42-mer y se observa una considerable reducción del grado de hidrólisis del aducto respecto a OBD. Estos resultados son compatibles con la posibilidad de que Y115, potenciada por D42, esté involucrada en la hidrólisis del aducto. En cualquier caso los residuos Y115 y D42 no parecen ser los únicos implicados en la hidrólisis, que sigue sucediendo aunque dichos residuos sean sustituidos.

En cuanto a H102, su localización y orientación (figura 6) apuntan a que podría estar involucrada en la desprotonación de Y99, favoreciendo el ataque nucleofílico de este residuo catalítico al enlace fosfodiéster. El hecho de que el mutante OBD^{H102A} presente una actividad enzimática más deteriorada que OBD^{Y99A} (figuras 28B y 29, y tabla 11) podría deberse a que, en efecto, el residuo H102, además de ser uno de los residuos catalíticos, tenga la función de desprotonar a Y99. Respecto a K112, pese a que su orientación podría inducir a creer que interacciona con el DNA favoreciendo el posicionamiento del enlace fosfato a escindir (figura 6), no parece tener relevancia, ya que la actividad y el patrón de bandas de OBD^{K112A} son muy similares a los de la proteína nativa. El motivo por el que OBD^{H102AK112A} presenta una sutil disminución de la actividad enzimática respecto a OBD^{H102A} podría ser una excesiva modificación de las cargas y de la hidrofobicidad del centro activo (figuras 28 y 29, y tablas 10 y 11).

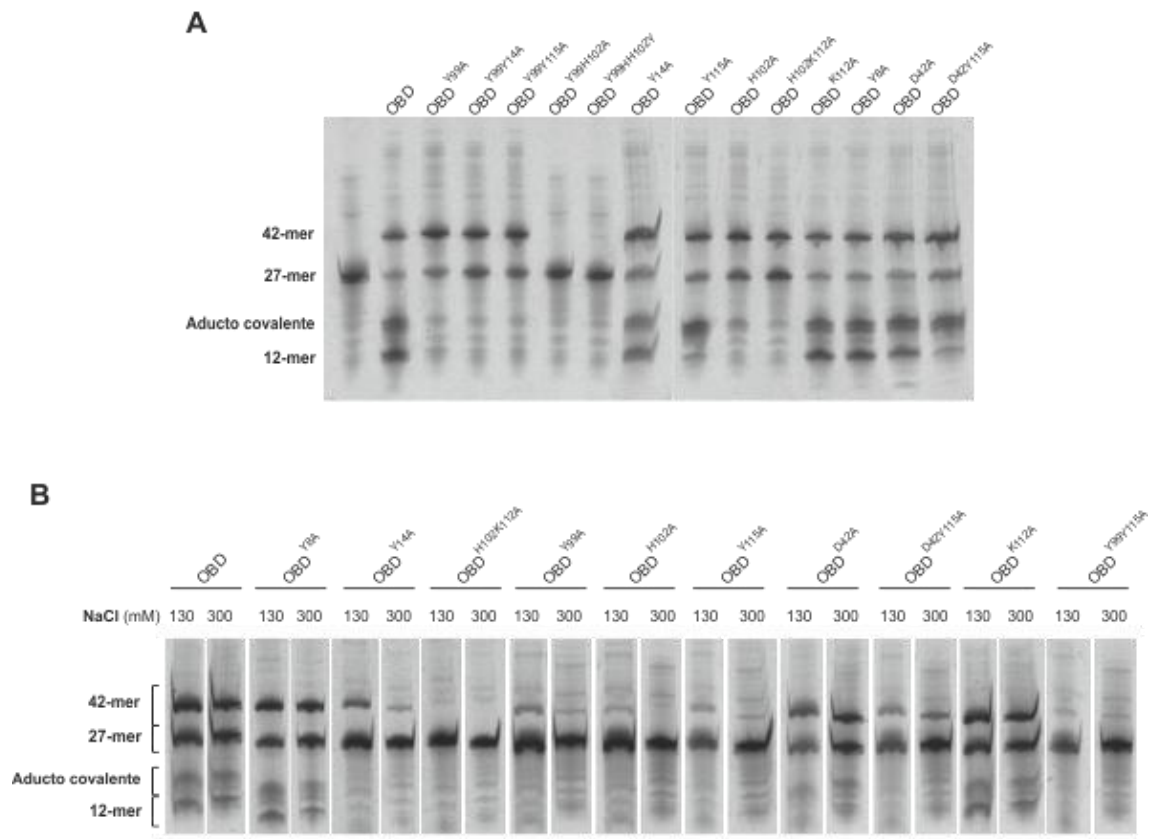


Figura 28. **Análisis de los productos de la actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes.** Se utilizaron geles desnaturalizantes de PAA al 20% y urea 6 M. El esquema de la reacción subyacente se muestra en la figura 26B. (A) Se empleó 2,5 μ M de proteína, 0,5 μ M del oligo sustrato fx23+4f3' (27-mer), 5 μ M del oligo sustrato de la reacción de transferencia de cadena ST30 (30-mer), 7,5 μ M de Mn^{2+} y 300 mM de NaCl; la incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 5 min. Bajo estas condiciones se aprecian claramente diferencias en el patrón de bandas para las diferentes proteínas. Cabe destacar que el único mutante que presenta la actividad enzimática totalmente abolida es OBD^{Y99H102A}. (B) Las condiciones empleadas son apropiadas para medir la actividad enzimática: 25 nM de proteína, 250 nM del oligo sustrato fx23+4f3' (27-mer), 2,5 μ M del oligo sustrato de la reacción de transferencia de cadena ST30 (30-mer), 2 mM de Mn^{2+} y 130 o 300 mM de NaCl; la incubación tuvo lugar a 37 °C durante 30 min.

Tabla 10. **Patrón de productos resultantes de la actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes en el centro activo.** Los valores recogidos en esta tabla corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes realizados en las condiciones descritas en la figura 28A.

Proteína	(Condiciones de exceso de proteína)			
	% de productos de reacción	Fracción de cada producto		
		producto de transferencia de cadena	aducto covalente	oligo 12-mer
OBD	90±2	0,24±0,01	0,40±0,03	0,36±0,01
OBD ^{Y99A}	70±4	0,77±0,05	0,11±0,01	0,13±0,01
OBD ^{Y99Y14A}	53±6	0,80±0,1	0,13±0,02	0,11±0,03
OBD ^{Y99Y115A}	67±12	0,80±0,10	0,10±0,01	0,11±0,05
OBD ^{Y99H102A}	-	-	-	-
OBD ^{Y99HH102Y}	15±4	0,18±0,04	0,6±0,1	0,18±0,03
OBD ^{Y14A}	79±9	0,39±0,03	0,31±0,01	0,31±0,08
OBD ^{Y115A}	85±1	0,38±0,01	0,50±0,03	0,12±0,01
OBD ^{H102A}	66±4	0,71±0,02	0,23±0,01	0,06±0,01
OBD ^{H102K112A}	47±4	0,78±0,06	0,16±0,01	0,06±0,02
OBD ^{K112A}	89±2	0,27±0,03	0,37±0,01	0,36±0,04
OBD ^{Y8A}	90±1	0,28±0,03	0,38±0,03	0,33±0,02
OBD ^{D42A}	87±3	0,36±0,02	0,38±0,03	0,26±0,03
OBD ^{D42Y115A}	83,8±0,9	0,39±0,01	0,47±0,01	0,14±0,01

Tabla 11. **Actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes en el centro activo.** Los valores recogidos en esta tabla se obtuvieron del ensayo de la figura 28B.

Proteína	(Condiciones de exceso de oligo)	
	% de productos de reacción (130 mM NaCl)	% de productos de reacción (300 mM NaCl)
OBD	61,2	59,2
OBD ^{Y99A}	21,3	12,2
OBD ^{Y99Y115A}	16,9	8,8
OBD ^{Y14A}	30,5	15,6
OBD ^{Y115A}	23,4	13,9
OBD ^{H102A}	13,7	-

OBD ^{H102K112A}	13,4	7,7
OBD ^{K112A}	60,6	53,4
OBD ^{Y8A}	68,9	54,1
OBD ^{D42A}	58,1	52,1
OBD ^{D42Y115A}	26,8	20,2

Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos en los que se analizaba el patrón de productos resultantes de la actividad enzimática se llevaron a cabo tanto a una concentración de Mn²⁺ de 7,5 µM (figura 28A y tabla 10) como en condición de saturación de Mn²⁺ (1 mM; resultados no mostrados), obteniéndose en ambos casos similares resultados para todas las formas mutantes de OBD, a excepción de OBD^{Y99Y14A}, que presenta mayor actividad enzimática global en condición de exceso de catión, aunque el patrón de bandas se conserva (las fracciones de aducto covalente y de oligo 12-mer siguen siendo muy bajas).

Para determinar si las sustituciones de residuos del centro activo únicamente afectaban a la actividad enzimática, se analizó la capacidad de unión de los distintos mutantes al dsDNA específico (DDRC) mediante EMSA. Aunque para la mayoría no se observaron diferencias importantes respecto a la proteína nativa, en OBD^{Y8A} y OBD^{D42A} las diferencias fueron significativas. En el caso de OBD^{Y8A} aumentó la afinidad por DDRC, mientras que en el de OBD^{D42A} disminuyó (figura 29). Pese a que desconocemos el motivo de estas alteraciones, una posible explicación sería que el plegamiento global del dominio OBD se viera afectado como consecuencia de estas mutaciones, lo que podría acarrear cambios en la superficie de interacción de la proteína con el dsDNA.

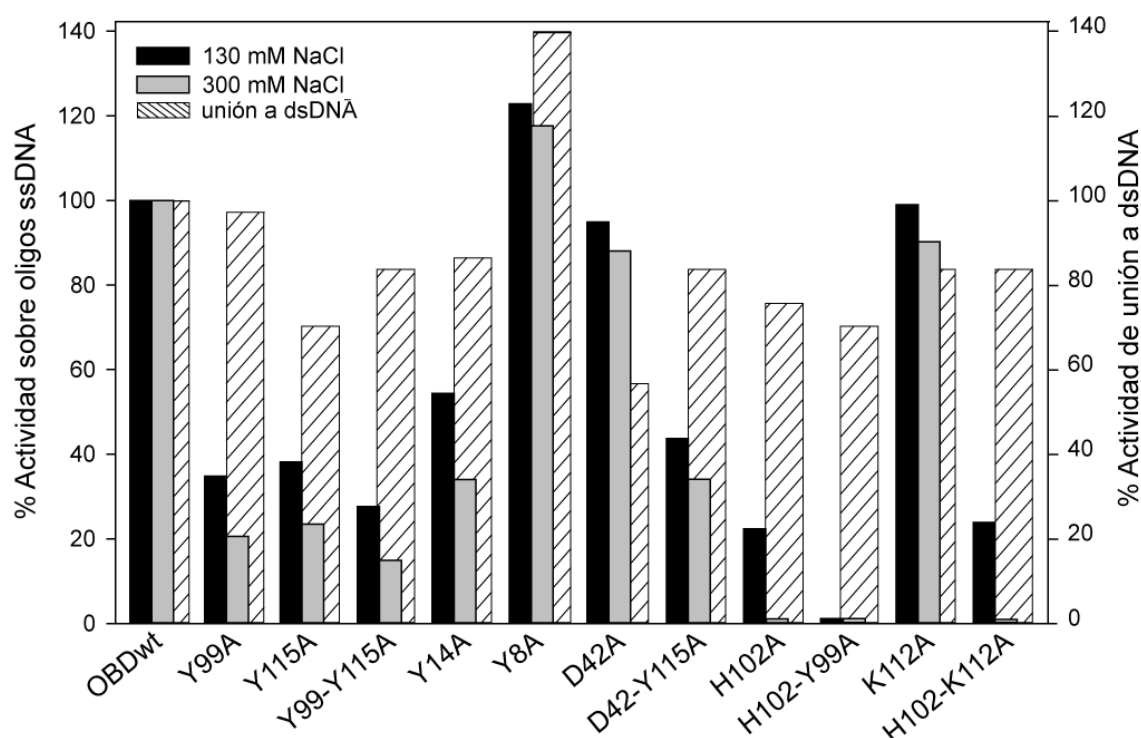


Figura 29. **Análisis de la capacidad de unión a dsDNA y la actividad enzimática de los mutantes de OBD con sustituciones en el centro activo en comparación con OBD nativa.** Los niveles de actividad enzimática provienen de la tabla 11. Para determinar la capacidad de unión a dsDNA se realizaron EMSAs (tal y como se describe en el apartado 19 de Métodos) en los que se empleó 2,5 μ M de proteína, 20 nM de DDRCf y 300 mM de NaCl. Tanto los niveles de actividad enzimática como los de unión a DNA se encuentran normalizados respecto a los obtenidos para OBD.

También se quiso estudiar el transcurso de la reacción a lo largo de un máximo de 30 min para OBD y los mutantes de interés del centro activo. Para ello se analizó la evolución a lo largo del tiempo del patrón de los productos resultantes de la actividad enzimática. Se empleó 2,5 μ M de proteína, 0,5 μ M del oligo sustrato fx23+4f3', 5 μ M del oligo ST30, 1 mM de Mn^{2+} y 430 o 130 mM de NaCl (figuras 30 y 31, respectivamente).

A la hora de interpretar los resultados referentes al transcurso de la reacción a lo largo del tiempo se debe tener en cuenta el carácter irreversible del producto 12-mer. El aducto acaba generando tanto producto 42-mer por transferencia de cadena, como oligo 12-mer por hidrólisis del enlace covalente. Mientras que el producto 42-mer es también sustrato de la reacción de corte, pudiendo volver a formar el aducto covalente, la formación del oligo 12-mer es irreversible, ya que la actividad de transferencia de cadena requiere la activación, por unión covalente de la proteína, del extremo 5' que va a ser transferido. Por tanto, y debido a la labilidad del enlace

covalente proteína-DNA, el producto 12-mer se acumula conforme avanza el tiempo. En la figura 30 se muestran los ensayos de transcurso de la reacción enzimática. En el caso de OBD, el aducto covalente es el producto predominante en un principio y disminuye progresivamente con el transcurso del tiempo; el oligo 42-mer también disminuye y el producto 12-mer aumenta hasta convertirse en el producto mayoritario. El transcurso de la reacción de los mutantes OBD^{K112A} y OBD^{D42A} es muy similar al observado para OBD. También se aprecia en estos ensayos la estabilización del aducto covalente en los mutantes OBD^{Y115} y OBD^{D42Y115A} con respecto a OBD que se refleja en una mayor proporción de aducto covalente frente a producto 12-mer. No obstante la sustitución Y115A parece afectar más a la actividad global de la proteína que la doble sustitución Y115D42A. Por otro lado, para los mutantes OBD^{Y99A}, OBD^{H102A} y OBD^{Y99Y115A} se observa la formación progresiva del oligo 42-mer resultante de la transferencia de cadena, manteniéndose prácticamente indetectable la cantidad de los otros dos productos. En el caso de OBD^{Y99A} y OBD^{H102A}, la prevalencia del producto 42-mer, que ya ha sido mostrado anteriormente (figura 28A y tabla 10), podría deberse a una mayor facilidad por parte del DNA con el extremo 3'-OH libre para introducirse en el centro activo, facilitando así la transferencia de cadena. Respecto a OBD^{Y115A}, cabe destacar que los niveles de actividad al aumentar la concentración de NaCl de 300 mM (figura 28A) a 430 mM (figura 30) se reducen notablemente, hecho que no sucede con el resto de mutantes.

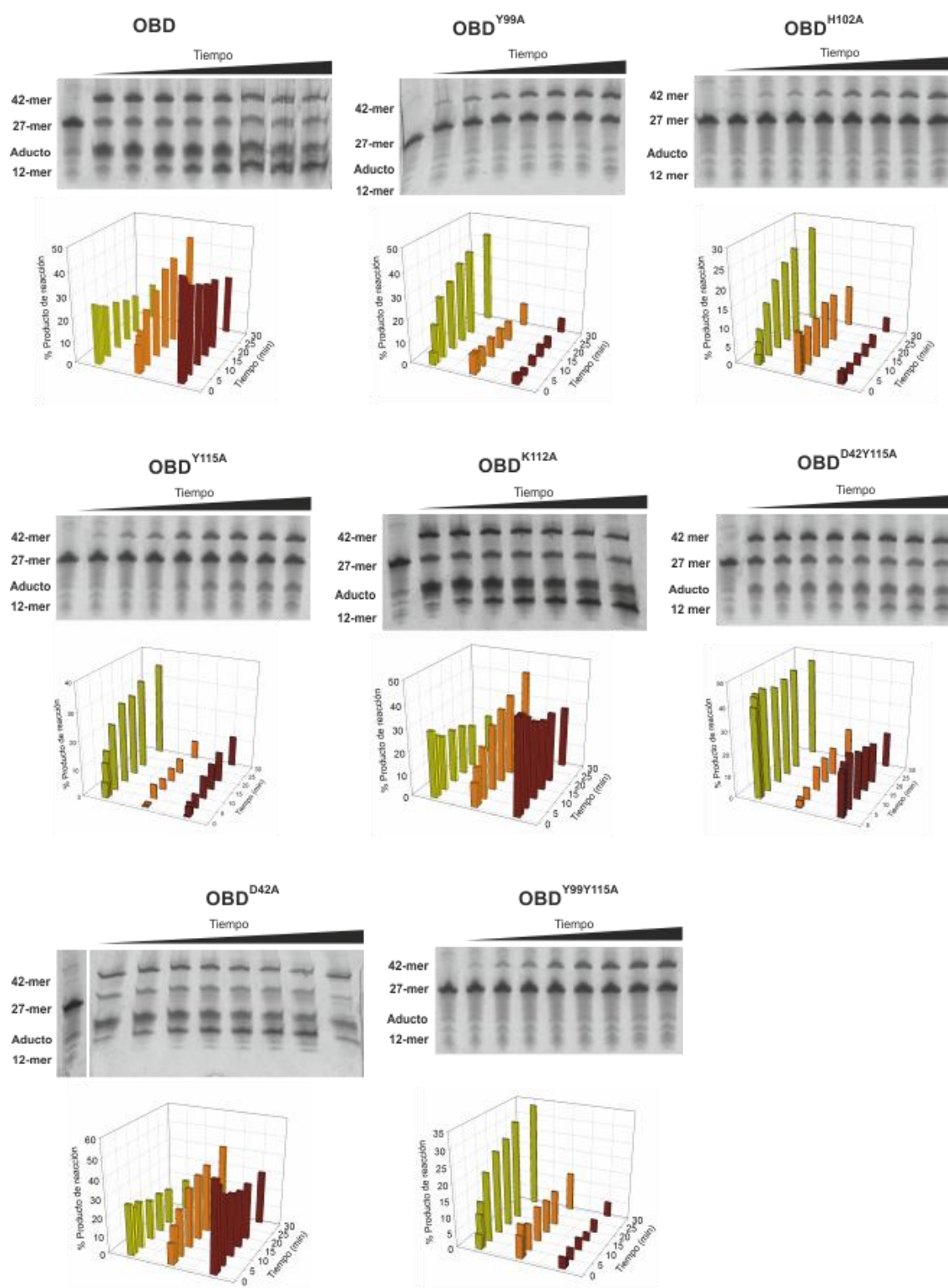


Figura 30. Análisis del patrón de productos resultante de la actividad enzimática de OBD y sus formas mutantes a lo largo del tiempo, a una concentración de NaCl de 430 mM. Se empleó 2,5 μ M de proteína, 0,5 μ M del oligo sustrato fx23+4f3' (27-mer), 5 μ M del oligo sustrato de la reacción de transferencia de cadena ST30 (30-mer), 1 mM de Mn²⁺ y 430 mM de NaCl. Se tomaron muestras de la mezcla de reacción, incubada a 37 °C, a intervalos de tiempo (1, 1,5, 3, 5, 7, 10, 20 y 30 min). Para cada proteína se muestra el gel de electroforesis correspondiente y una gráfica que refleja la evolución de la proporción de DNA fluorescente correspondiente a cada producto de reacción, donde se indica en marrón

el aducto covalente, en naranja el fragmento 3' resultante del corte (12-mer) y en verde el producto de transferencia de cadena (42-mer).

El transcurso de la reacción a lo largo del tiempo también se estudió a una concentración de NaCl de 130 mM. Como se mostró anteriormente, a concentraciones inferiores de sal se observa mayor actividad enzimática global en todos los casos (figura 28B y tabla 11); esto podría deberse a la influencia de la sal en las interacciones iónicas que participan en el posicionamiento del DNA respecto a la proteína. Se estudió la evolución del patrón de bandas en el tiempo a una concentración de 130 mM de NaCl para OBD, OBD^{Y99A} y OBD^{H102A}. En los casos de OBD y OBD^{H102A} no se observan diferencias del patrón de bandas entre ambas concentraciones de NaCl. Sin embargo, durante todo el transcurso de la reacción OBD^{Y99A} presenta una mejoría en la actividad de transferencia de cadena a 130 mM de NaCl (figura 31) en comparación con lo que sucede a 430 mM (figura 30).

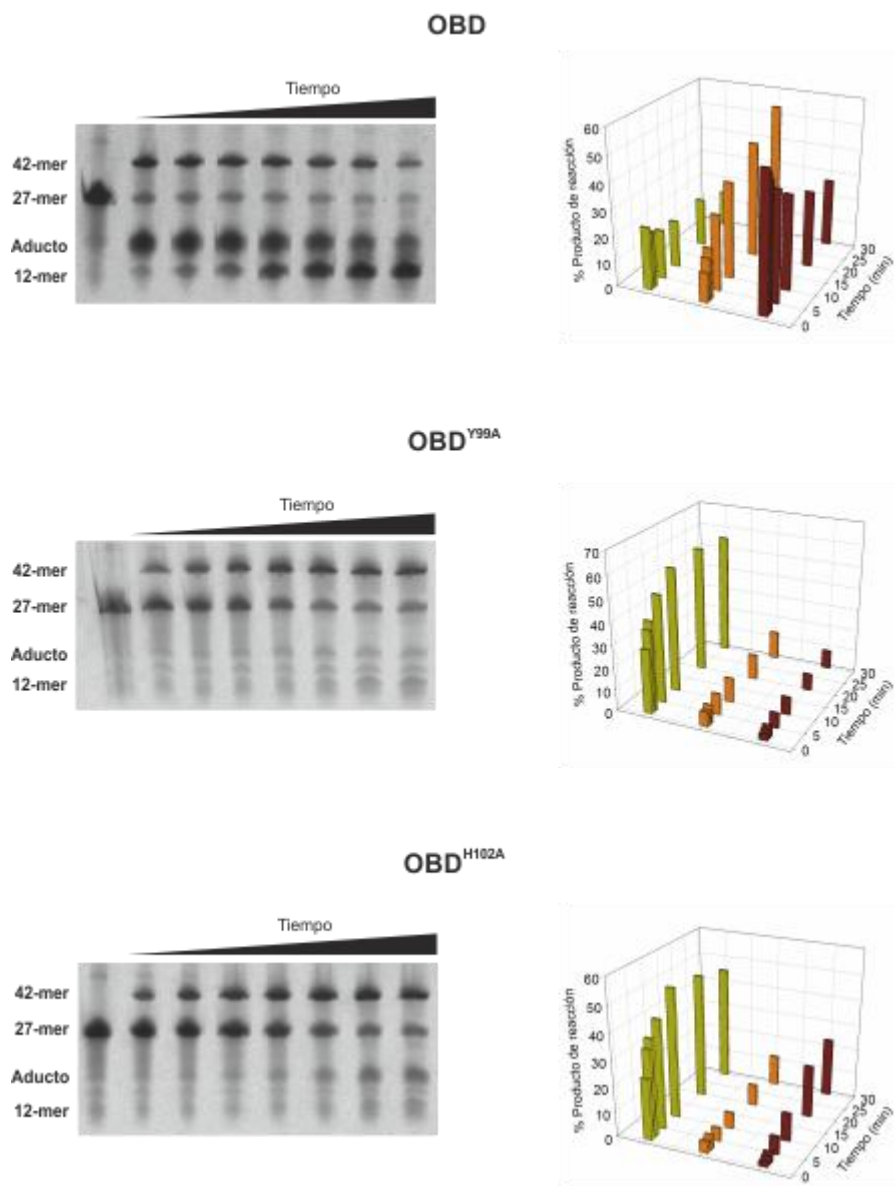


Figura 31. **Análisis del patrón de productos resultante de la actividad enzimática a lo largo del tiempo para OBD y las formas mutantes OBD^{Y99A} y OBD^{H102A} a una concentración de NaCl de 130 mM.** Se empleó 2,5 μ M de proteína, 0,5 μ M del oligo sustrato fx23+4f3' (27-mer), 5 μ M del oligo sustrato de la reacción de transferencia de cadena ST30 (30-mer), y 1 mM de Mn²⁺; la concentración de NaCl fue 130 mM. Se tomaron muestras de la mezcla de reacción, incubada a 37 °C, a intervalos de tiempo hasta alcanzar un tiempo de reacción total de 30 min. Para cada proteína se muestra el gel de electroforesis correspondiente y una gráfica que refleja la evolución de la proporción de DNA fluorescente correspondiente a los distintos productos de reacción, donde se indica en marrón el aducto covalente, en naranja el fragmento 3' resultante del corte (12-mer) y en verde el producto de transferencia de cadena (42-mer).

5. EL CATIÓN METÁLICO DEL CENTRO ACTIVO DE RepB Y SU EFECTO EN LA ESTABILIDAD ESTRUCTURAL Y EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA

El catión metálico de RepB, que junto a algunos residuos aminoacídicos de su entorno constituye el centro activo, es fundamental tanto para la actividad enzimática como para la termoestabilidad estructural de la proteína. Los aspectos que se tratan en este apartado son: la estabilización que aporta el catión a la estructura de la proteína, la afinidad de RepB por el catión Mn^{2+} y la posibilidad de que el catión tenga un segundo papel en el mecanismo enzimático, adicional al que desempeña en el centro activo.

Previamente a esta tesis ya se había estudiado la influencia de la temperatura en la estabilidad estructural de RepB₆, así como en su actividad enzimática. En cuanto a la estabilidad estructural, análisis por CD habían revelado que la desnaturalización térmica de RepB₆ tiene lugar mediante dos procesos irreversibles. La proteína sufre una primera transición térmica irreversible a una temperatura fisiológicamente relevante para el huésped de pMV158, 32-45 °C, y una segunda transición térmica a 80 °C (figura 32A; (Ruiz-Masó, López-Zumel et al. 2004). Además, con el fin de comparar la transición térmica observada por CD tanto a 218 nm como a 282 nm, se había realizado un ajuste de los datos experimentales a un modelo de dos estados. Al representar los valores normalizados frente a la temperatura se observa que ambas curvas coinciden, lo que indica que el mismo cambio conformacional afecta a la estructura secundaria y terciaria de RepB₆ (figura 32B). Respecto a la actividad enzimática, se había observado que la proteína RepB₆ calentada a 45 °C en ausencia de Mn^{2+} , a diferencia de la no calentada, es incapaz de relajar el sustrato de DNA plasmídico superenrollado, y además pierde la capacidad de unión a dsDNA (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016).

En este trabajo se ha continuado estudiando la influencia de la temperatura en la estructura (en colaboración con el grupo de la Dra. Margarita Menéndez, IQFR-CSIC) y actividad de RepB. Por un lado, los análisis por CD anteriormente mencionados se completaron al determinar, mediante ultracentrifugación analítica, el estado de oligomerización de RepB₆ calentada a diferentes temperaturas en un rango comprendido entre 25 y 75 °C (figura 32A). Estos análisis revelaron que tras la primera transición, que incrementa ligeramente el contenido de hélice- α y afecta también a la estructura terciaria de la proteína (figura 32B), la proteína se vuelve propensa a la

auto-asociación. Cuando se alcanza una temperatura de 80 °C tiene lugar la segunda transición térmica, que conlleva la precipitación de la proteína (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016). Por otro lado se analizó la actividad enzimática mostrada por RepB₆ (50, 150, 300, 600, 900 y 1200 nM) sobre el oligo sustrato 23-mer (100 nM) durante 10 min a diferentes temperaturas (30, 37 y 60 °C), en presencia de 20 mM de Mn²⁺ (figura 33). En este tipo de ensayo se observó el mismo nivel de actividad enzimática a las tres temperaturas, y precisamente la ausencia de inactivación a una temperatura superior a 45 °C nos llevó a pensar que la presencia del catión Mn²⁺ podría ser el motivo de la mejora en la termoestabilidad de la proteína.

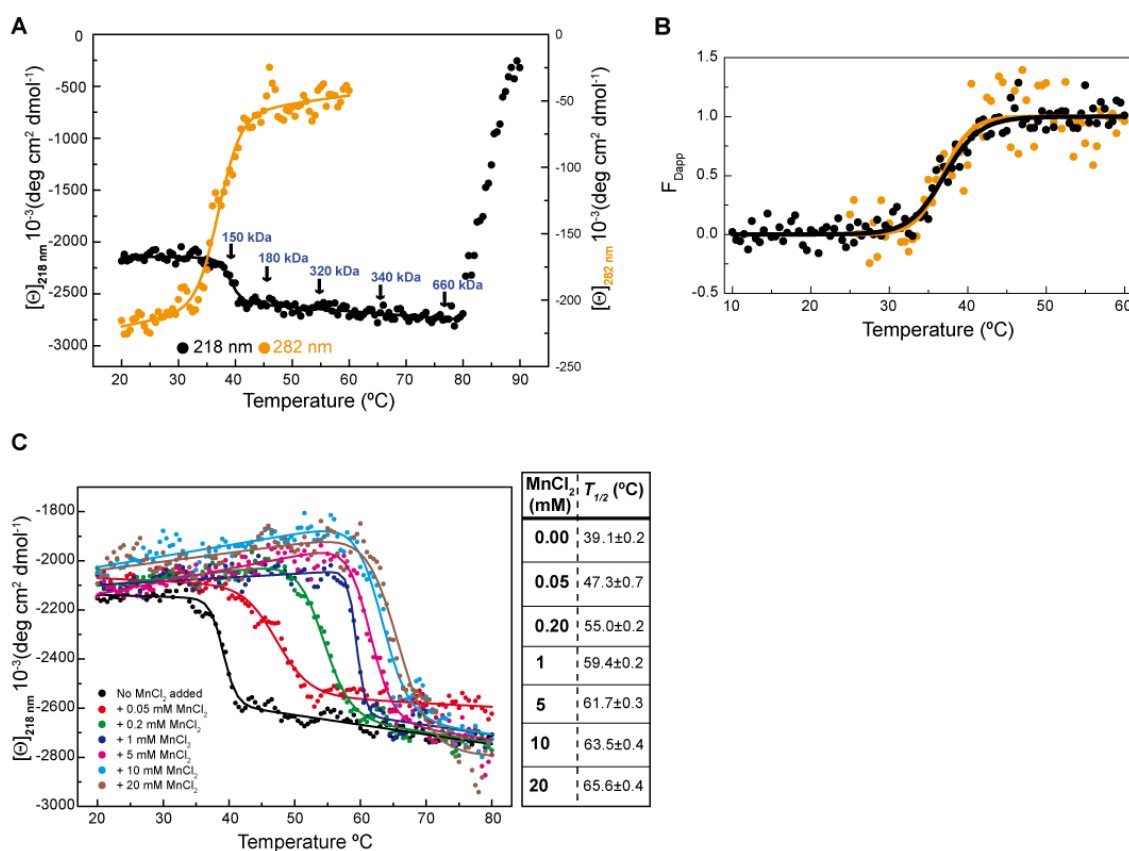


Figura 32. Análisis de la estabilidad térmica de RepB. Cambios conformacionales de RepB₆ asociados al incremento de la temperatura, analizados por CD. (A) Se muestran las curvas de transición térmica monitorizadas por CD a 218 (negro) y 282 nm (naranja). Muestras calentadas a las temperaturas indicadas fueron analizadas por ultracentrifugación analítica; la estimación de las masas moleculares se muestra sobre la curva de transición a 218 nm. (B) Los datos experimentales del ensayo del panel A se ajustaron a un modelo de dos estados. F_{Dapp} representa la fracción aparente de RepB₆ en el estado de conformación inducido por el aumento de la temperatura. La coincidencia de las curvas de transición registradas a 218 nm (negro) y a 282 nm (naranja) indica que el mismo cambio conformacional afecta tanto a la estructura secundaria como a la estructura terciaria de RepB. (C) Curvas de transición térmica de RepB₆ (12 μM) en presencia de concentraciones crecientes de MnCl₂ (indicadas en la imagen) registradas a 218 nm. También se muestra una tabla con la temperatura media de transición aparente

($T_{1/2}$) correspondiente a cada concentración de catión. Imagen tomada de (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016).

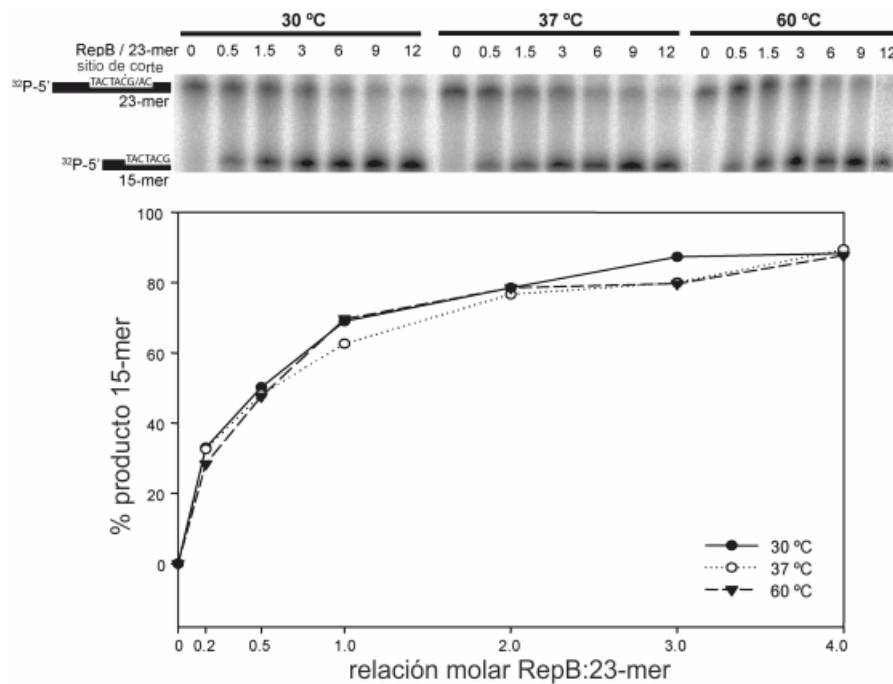


Figura 33. **Análisis de la actividad de RepB₆ sobre un oligo ssDNA a diferentes temperaturas en presencia de un exceso de Mn²⁺.** Una concentración de 100 nM del oligo sustrato 23-mer que contiene el sitio de corte y está marcado radiativamente en 5' se incubó con concentraciones crecientes de RepB₆ (50, 150, 300, 600, 900 y 1200 nM) a tres temperaturas (30, 37, y 60 °C) en presencia de 20 mM de MnCl₂ y 300 mM de NaCl. Los productos fueron separados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de 20% PAA y urea 8 M. Imagen tomada de (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016).

Para comprobar si el catión es capaz de mejorar la termoestabilidad de RepB₆ se llevaron a cabo ensayos de CD en presencia de Mn²⁺. En primer lugar se comparó el espectro de CD (regiones cercana y lejana del UV) de la proteína en ausencia y en presencia de MnCl₂, no encontrándose diferencias significativas ni en la estructura secundaria ni en la terciaria/cuaternaria (resultados no mostrados). A continuación se realizaron experimentos de desnaturalización térmica en presencia de Mn²⁺ en un rango de concentraciones entre 0,05 y 20 mM, monitorizando la primera transición térmica mediante la variación de la elipticidad a 218 nm (figura 32C). Se observó una fuerte estabilización de RepB₆ en presencia del catión, ya que la primera transición térmica se vio retrasada desde una temperatura media de transición aparente ($T_{1/2}$) de ~39 °C hasta una $T_{1/2}$ de ~66 °C por la adición de Mn²⁺ a una concentración de 20 mM. En contraste, la adición de otros cationes como Mg²⁺ o Ca²⁺ no tuvo ese efecto

estabilizador (resultados no mostrados). Respecto a la segunda transición térmica, el ion Mn^{2+} no es capaz de impedirla (resultados no mostrados).

Para conocer si las transiciones térmicas afectaban a un dominio de RepB en particular se analizó mediante CD la estabilidad térmica de cada uno de los dominios por separado. La curva de transición térmica a 218 nm para OD reveló que este dominio sufre una única transición térmica, correspondiente a la precipitación visible de la proteína, por encima de 78 °C, que se retrasó ~5 °C por la adición de Mn^{2+} 1 mM; este efecto también se observó por la adición de Mg^{2+} (resultados no mostrados). OBD sufrió un único cambio estructural irreversible a una $T_{1/2}$ de unos 51,5 °C, que se retrasó ~13 °C por la adición de 5 mM de Mn^{2+} (figura 34), y que parece corresponder a la primera transición térmica de RepB₆. Adicionalmente se analizó el mutante de OBD en el que el residuo D42, involucrado en la unión de Mn^{2+} en el centro activo, fue sustituido por A. En ausencia de catión las estabilidades térmicas de OBD y OBD^{D42A} fueron similares, siendo la $T_{1/2}$ 50,5 °C para OBD^{D42A} y 51,5 °C para OBD (figura 34A), y tampoco se observaron diferencias entre OBD y OBD^{D42A} en los ensayos de CD a 20 °C cuando se añadió Mn^{2+} (resultados no mostrados). Sin embargo, a bajas concentraciones de catión la transición térmica sucedía antes para OBD^{D42A} que para OBD (figura 34B), lo que sugería que el mutante OBD^{D42A} podría tener disminuida su afinidad por el catión.

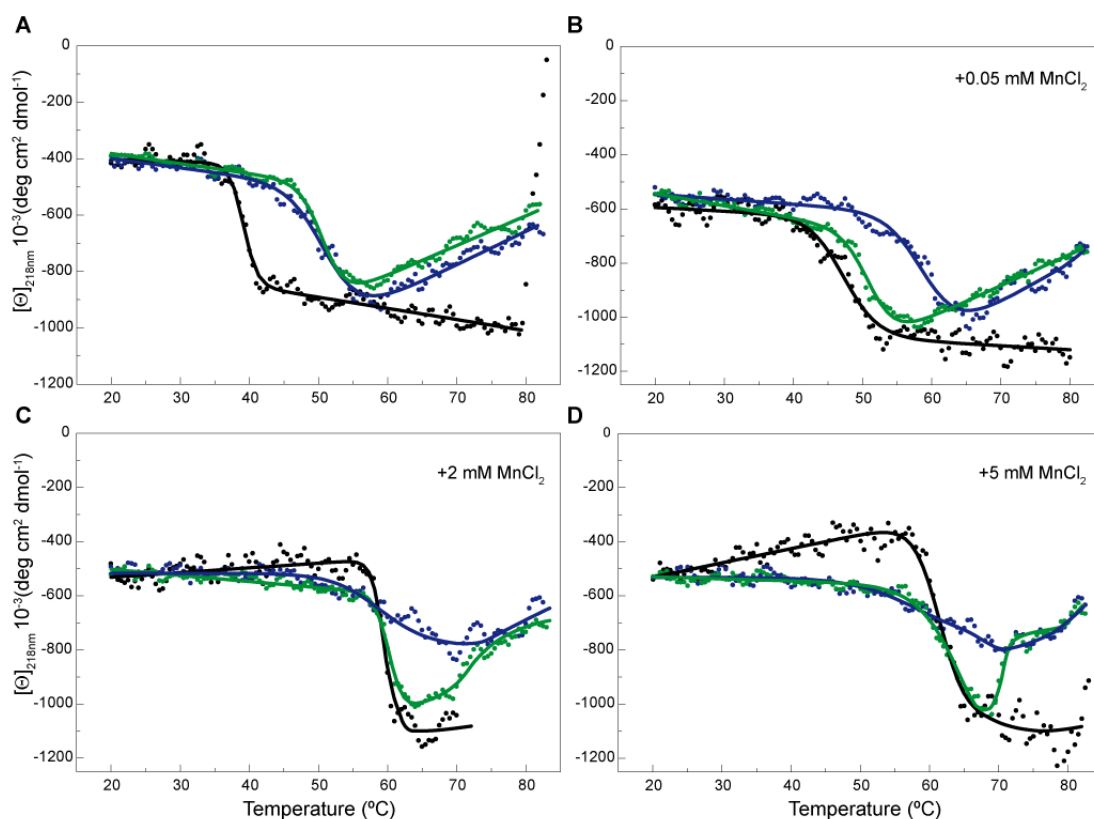


Figura 34. **Cambios, inducidos por aumento de la temperatura, en la estructura secundaria de RepB₆, OBD y OBD^{D42A}.** Curvas de transición térmica analizadas por CD a 218 nm para RepB₆ (negro), OBD (azul) y OBD^{D42A} (verde), en ausencia de MnCl₂ (A) o en presencia de 0,05 (B), 2 (C) y 5 (D) mM de MnCl₂. Imagen tomada de (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016).

En relación con los ensayos anteriores nos pareció interesante estudiar la unión del catión Mn^{2+} a RepB. En colaboración con el grupo de la Dra. Margarita Menéndez se realizaron ensayos de calorimetría isoterma de titulación (ITC) a 25 °C entre RepB₆, OBD u OBD^{D42A} y el catión Mn^{2+} . El análisis de las isotermas reveló tanto la constante de afinidad (Kb) como el número de sitios titulables de unión. Cada protómero de RepB₆ se une a un catión Mn^{2+} ($0,87 \pm 0,01$ sitios/protómero) con alta afinidad ($Kb = (2,5 \pm 0,7) \times 10^7 M^{-1}$). La afinidad entre OBD y Mn^{2+} es bastante similar ($Kb = (2,4 \pm 0,8) \times 10^7 M^{-1}$), pero el número de sitios de unión se reduce drásticamente ($0,47 \pm 0,01$ sitios/monómero), quizás debido a que muchas de las moléculas de OBD ya presentaban los sitios de unión a metal ocupados por catión con anterioridad al ensayo de ITC. Por el contrario, el número de sitios para OBD^{D42A} (0,82) es comparable al de la proteína silvestre completa, aunque su afinidad por el catión se reduce aproximadamente 30 veces ($Kb = (8,63 \pm 0,08) \times 10^5 M^{-1}$), (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016), lo que demuestra que el sitio de unión de alta afinidad del Mn^{2+} corresponde al centro activo de OBD.

Adicionalmente se estudió la afinidad entre RepB₆, OBD u OBD^{D42A} y el catión Mn²⁺ mediante experimentos de actividad enzimática en presencia de distintas concentraciones de Mn²⁺, con el objetivo de comparar los resultados con los obtenidos por ITC. Para estos ensayos de titulación fueron necesarios ciertos ajustes de la metodología, ya que se observó actividad enzimática aun sin añadir catión. Se trató de quelar el catión unido a la proteína, para lo que esta se incubó con EDTA y a continuación se dializó frente a tampón H suplementado con 1 M de NaCl y Chelex. Este mismo tratamiento fue llevado a cabo para todos los componentes de la mezcla de reacción. Sin embargo, a pesar de que tras este tratamiento se redujo la actividad, no fuimos capaces de anularla completamente ni en el caso de OBD ni en el de RepB₆, aunque cabe destacar que en presencia de EDTA no se observa actividad enzimática (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016). Además se comprobó que las trazas de Mn²⁺ en los otros cationes empleados eran irrelevantes. Ya que la actividad enzimática lleva implícita la unión del catión a la proteína, a la hora de realizar los ensayos de titulación se asumió que el incremento de actividad que se observa al añadir catión reflejaba la saturación de los sitios de unión a catión disponibles. Bajo estas premisas se determinaron las constantes de disociación aparentes. Respecto a las condiciones experimentales, la dilución de proteínas se llevó a cabo en Tris-HCl 20 mM pH 8,0 suplementado con 430 mM de NaCl y 0,2 mg/ml de BSA. La mezcla de reacción se compuso de tampón B suplementado con NaCl hasta una concentración final de 300 mM, 0,5 µM de oligo fx23+4f3' (27-mer), 5 µM del oligo ST30 (30-mer), 50 nM de proteína y concentraciones crecientes de catión (0,1-1000 µM) o en ausencia de este. La incubación se realizó durante 1 min a 37 °C y fue seguida de digestión con proteinasa K (figura 35). Se llevaron a cabo al menos tres repeticiones de cada ensayo.

En el caso de OBD, la constante de disociación aparente fue 0,5±0,3 µM, y la actividad máxima se observó en torno a 5 µM de Mn²⁺. Para OBD^{D42A}, la afinidad se redujo considerablemente, ya que la constante de disociación aparente fue 2,6±0,6 µM, unas 5 veces superior que la de OBD, y la actividad máxima se observó en torno a 50 µM de Mn²⁺ (figura 35). La constante de disociación aparente de Mn²⁺ inferida para OBD^{D42A} a partir de los ensayos de actividad (~2,6 µM) se asemeja notablemente al valor de K_d obtenido por extrapolación a 37 °C de la constante determinada por ITC (~2 µM), mientras que la de OBD (~0,5 µM) es alrededor de 9 veces mayor que el valor derivado de ITC extrapolando para 37°C (~57 nM). Esta aparente discrepancia podría deberse a los errores de las mediciones de la actividad y al pequeño incremento neto de la actividad de OBD saturado por Mn²⁺ con respecto a la actividad

en ausencia de Mn²⁺ añadido, cuyo elevado valor probablemente se deba a la captura de trazas Mn²⁺ presentes en la mezcla de reacción.

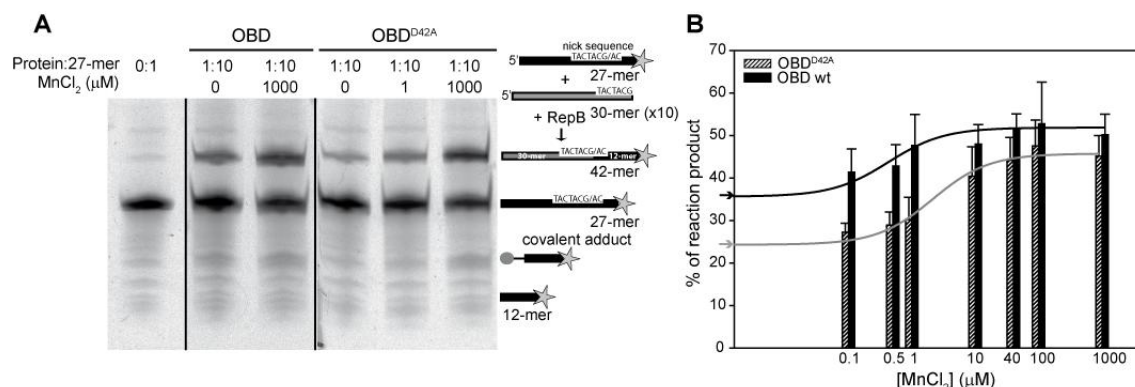


Figura 35. **Actividades de corte y de transferencia de cadena de OBD y OBD^{D42A} sobre oligos monocatenarios en presencia de diferentes concentraciones de Mn²⁺.** (A) Las mezclas de reacción contenían 500 nM del oligo fx23+4f3' (27-mer), 5000 nM del oligo ST30 (30-mer), 50 nM de cada una de las proteínas y diferentes concentraciones de Mn²⁺. Transcurrido 1 min de incubación a 37 °C, se detuvo la reacción con 0,1% de SDS y una concentración final de 125 μg/ml de proteinasa K. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de 20% PAA y 6 M de urea. A la derecha del gel se muestra un esquema de los sustratos y productos correspondientes a este tipo de experimento. La estrella hace referencia al marcaje fluorescente, mientras que el círculo representa a la proteína. El producto de transferencia de cadena es mayoritariamente 42-mer, ya que el oligo 30-mer se encuentra en exceso (x10) respecto al 27-mer. (B) Diagrama de barras correspondiente a los porcentajes de productos de reacción obtenidos a partir de los experimentos de titulación de Mn²⁺ para OBD y OBD^{Y99A}. Cada barra corresponde al promedio de al menos tres ensayos; sobre cada barra se representa la desviación estándar. Imagen tomada de (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016).

Respecto a RepB₆, se observó la mitad de la actividad máxima en torno a 60 μM de Mn²⁺, un valor 3 órdenes de magnitud más alto que el valor de K_d obtenido por extrapolación a 37 °C de la constante determinada por ITC (~56 nM). Para RepB₆ adicionalmente se repitió el ensayo pero en presencia de una concentración constante de 0,2 mM de MgCl₂, lo que aumentó significativamente la actividad a concentraciones no saturantes de MnCl₂, sin variar por ello la actividad máxima de la proteína (figura 36). Para explicar este elevado requerimiento de catión por parte de RepB₆, que contrasta con lo observado en el caso de OBD, se realizaron ensayos de actividad en los que se compararon los patrones de bandas de productos de OBD y de RepB₆ a lo largo de un intervalo de tiempo de 30 min. Para ello se empleó 10 μM de proteína, una concentración de Mn²⁺ 1,5 veces mayor que la concentración de proteína (15 μM), 0,5 μM del oligo sustrato fx23+4f3 (27-mer) y 5 μM del oligo de transferencia de 18-mer ST18. La incubación se realizó a 37 °C y fue seguida de la digestión con proteinasa K.

En el caso de RepB₆ es predominante la reacción de transferencia de cadena, mientras que para OBD se observa una mayor formación de aducto, que desemboca en un claro predominio del producto de hidrólisis del aducto en los últimos tiempos estudiados (figura 37). Por otro lado, ya se ha mostrado con anterioridad que variaciones en la concentración de Mn²⁺ no implican alteraciones en el patrón de bandas para OBD, pero sí lo hacen para RepB₆: al aumentar la concentración de Mn²⁺ se incrementa la actividad total y la prioridad por el producto de transferencia de cadena se pierde (figura 36).

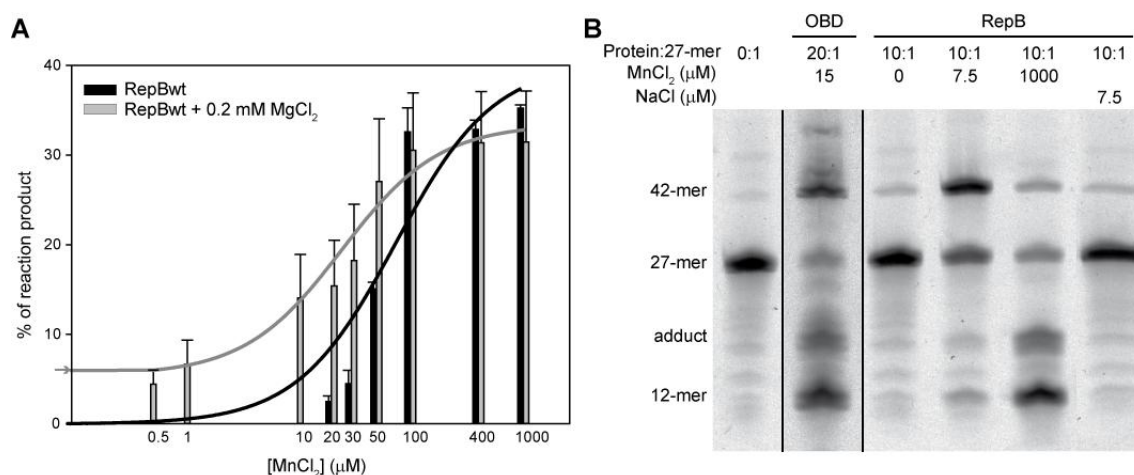


Figura 36. **Actividades de corte y de transferencia de cadena de RepB₆ sobre oligos monocatenarios en presencia de diferentes concentraciones de Mn²⁺.** (A) Diagrama de barras correspondiente a los porcentajes de productos de reacción obtenidos a partir de los experimentos de titulación de Mn²⁺ para RepB₆ en ausencia o en presencia de MgCl₂. Cada barra corresponde al promedio de al menos tres ensayos; sobre cada barra se representa la desviación estándar. Las mezclas de reacción contenían 500 nM del oligo fx23+4f3' (27-mer), 5000 nM del oligo ST30 (30-mer), una concentración final de NaCl de 300 mM, 50 nM de proteína, diferentes concentraciones de Mn²⁺, y en caso de añadir Mg²⁺, la concentración fue 0,2 mM. Transcurrido 1 min de incubación a 37 °C, se detuvo la reacción con 0,1% de SDS y una concentración final de 125 μg/ml de proteinasa K. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de 20% PAA y 6 M de urea. El esquema de la reacción se muestra en la figura 25. (B) Análisis mediante electroforesis en gel de 20% PAA y 6 M de urea de los productos de reacción para RepB₆ y OBD sobre oligos monocatenarios. Las condiciones de reacción para RepB₆ fueron las mismas que las descritas en (A), para los ensayos de OBD únicamente se varió la concentración de proteína (5 o 10 μM). Como control se analizó una mezcla de reacción para RepB₆ con NaCl (7,5 μM) en lugar de la sal de manganeso. Imagen tomada de (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016).

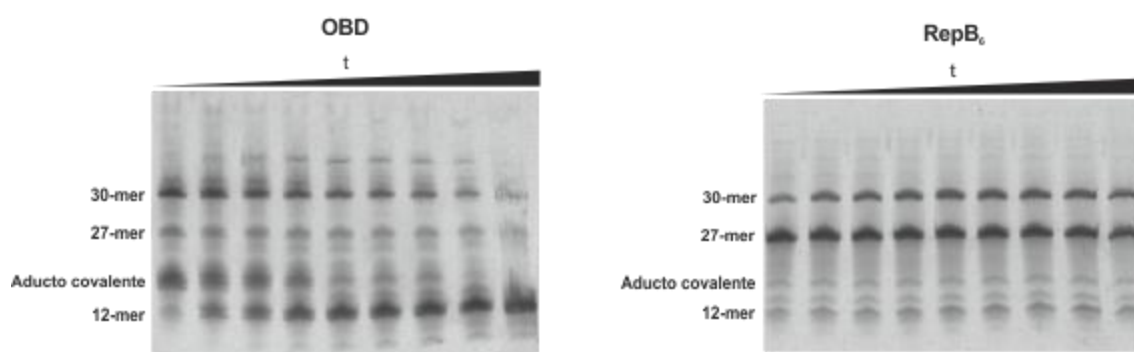


Figura 37. **Variación del patrón de productos resultantes de la reacción enzimática a lo largo del tiempo tanto para OBD como para RepB₆.** Se empleó 10 μ M de proteína (protómero), 15 μ M de Mn^{2+} , 0,5 μ M del oligo sustrato fx23+4f3 y 5 μ M de ST18. Las muestras se tomaron a intervalos de tiempo hasta alcanzar 30 min. Se trata de geles de PAA 20% y urea 6 M.

Se estableció, pues, la hipótesis según la cual un aumento de la concentración de Mn^{2+} favorecería la neutralización del DNA, mermando la unión de este con la proteína hexamérica; como consecuencia, tanto el producto 5' del corte como el oligo ST30 quedarían más débilmente unidos a la proteína y se dificultaría la transferencia de cadena. Lo anteriormente explicado es coherente con el hecho de que, cuando se aumenta la concentración de catión, el patrón de bandas de RepB₆ se asemeja al de OBD, que debe presentar menor afinidad tanto por el producto de corte como por el oligo ST30, quizás debido a que no posee el canal de carácter electropositivo que sí presenta la proteína hexamérica. Analizando este posible segundo papel del Mn^{2+} , se realizó un nuevo ensayo para determinar el patrón de bandas resultante de la actividad enzimática. Se empleó 5 μ M de RepB, 0,5 μ M del oligo sustrato fx23+4f3 y 5 μ M de ST30; respecto al catión, en este ensayo se empleó una concentración de Mn^{2+} de 7,5 μ M, es decir, 1,5 veces la concentración de proteína, y hasta 1 mM de NaCl o $MgCl_2$ (figura 38). En presencia de baja concentración de Mn^{2+} (7,5 μ M) se obtuvo el mismo patrón de productos independientemente de la adición de NaCl (hasta 1 mM). Sin embargo, completando la concentración de 7,5 μ M de Mn^{2+} hasta 1 mM con Mg^{2+} , sí que se consiguió el patrón de bandas obtenido al añadir 1 mM de Mn^{2+} . Por otra parte, al añadir únicamente 7,5 μ M de Mg^{2+} se observó menos corte total del sustrato en comparación con la muestra que sólo contiene 7,5 μ M de Mn^{2+} , aunque se obtuvo un patrón de bandas similar al obtenido para la. Este fue un resultado inesperado que no sabemos explicar puesto que Mg^{2+} parece no unirse al centro activo, no es capaz de producir la estabilización térmica de OBD y además se han realizado ensayos de competición por ITC entre Mg^{2+} y Mn^{2+} en los que no se ha detectado la unión de Mg^{2+} a RepB₆ (Ruiz-Masó, Bordanaba-Ruiseco et al. 2016). En cualquier caso, el papel

hipotético de Mn²⁺ de neutralizar el DNA, mermando la unión de este con la proteína, parece que podría ser llevado a cabo por Mg²⁺ pero no por Na⁺.

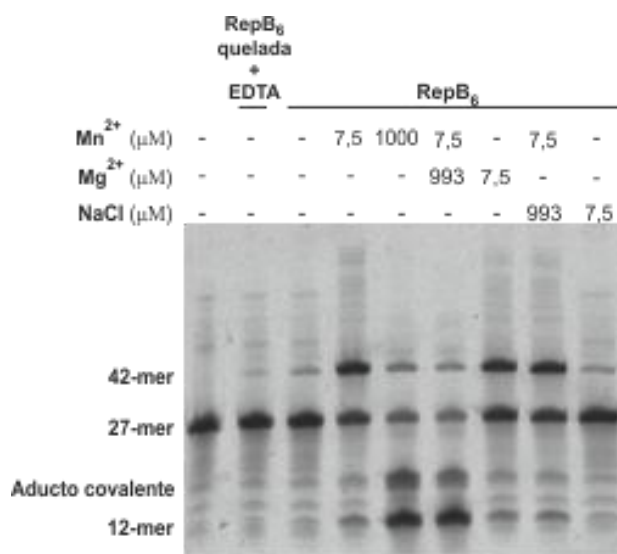


Figura 38. **Sustitución parcial de Mn²⁺ por otros cationes e implicaciones en la actividad enzimática de RepB₆.** Se empleó 5 μM de proteína, 0,5 μM del oligo sustrato fx23+4f3 y 5 μM de ST30. La incubación tuvo una duración de 5 min y fue a 37 °C. La proteína de la muestra del segundo pocillo fue la única sometida al tratamiento de quelación, además esta muestra fue suplementada con 1 mM de EDTA; sin embargo, no se consiguió abolir la actividad enzimática. Para el resto de pocillos se muestran las concentraciones de cationes.

El elevado requerimiento de catión por parte de RepB₆ en los ensayos de actividad también podría estar justificado por la existencia de un segundo sitio de unión a metal de baja afinidad. Dicho sitio no se localizaría en el dominio OBD, sino entre la región bisagra de un protómero y el dominio OD del mismo protómero o de otro adyacente (Boer, Ruiz-Masó et al. 2016). La saturación de los dos sitios de unión a catión podría ser necesaria para alcanzar la actividad enzimática máxima de RepB₆.

**ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE RepB₆
Y LA HELICASA PcrA DE NEUMOCOCO**

La actividad helicasa sobre el dsDNA plasmídico es necesaria para desplazar la cadena parental que sufrió la rotura endonucleolítica inicial, tanto en RCR como en conjugación. En el caso de la RCR de fagos y plásmidos, la helicasa es proporcionada por el huésped, y la promiscuidad de los plásmidos RC podría estar condicionada a la existencia de una interacción funcional entre el iniciador plasmídico y la helicasa de la superfamilia 1 (SF1) correspondiente (Ruiz-Masó, Anand et al. 2006).

Los ensayos de este capítulo se llevaron a cabo con la helicasa PcrA_{Spn}. Para la purificación de PcrA_{Spn}, descrita en el apartado 26 de Métodos, previamente se clonó el gen *pcrA* de neumococo en el vector pQE1, quedando dicho gen bajo el control del promotor del bacteriófago T5, reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*. La metodología consistió en amplificar mediante PCR el gen *pcrA* y ligarlo a pQE1 digerido con PvuII. El plásmido recombinante resultante se introdujo por electroporación en *E. coli*; mediante digestión del DNA recombinante se determinó que la orientación de *pcrA* era la adecuada, y para verificar la secuencia se recurrió a Secugen. En esta construcción la expresión génica se induce mediante IPTG y la proteína resultante posee en el extremo N-terminal una cola de His para su fácil purificación.

La proteína PcrA_{Spn} que se empleó en los experimentos descritos en este capítulo fue sometida al método de eliminación de la etiqueta de His y, subsecuentemente, su concentración fue determinada mediante Qubit. Los ensayos de actividad, descritos en el apartado 27 de Métodos, revelaron que, tras la purificación, PcrA_{Spn} conservaba su actividad helicasa, ya que era capaz de deshíbrida el oligo parcialmente bicatenario Top3tailCy5-Bot3taildu. La monitorización de la separación de las cadenas fue posible gracias a que una de las cadenas del oligo Top3tailCy5-Bot3taildu contiene el fluoróforo Cy5 (figura 39).

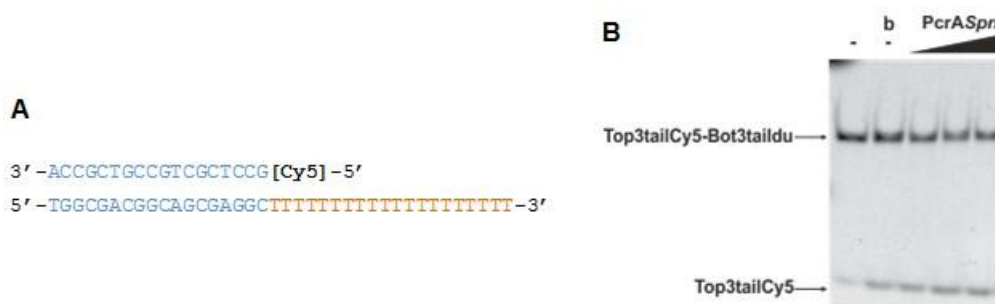


Figura 39. **Actividad helicasa de PcrA_{Spn} sobre el oligo Top3tailCy5-Bot3taildu.** (A) el oligo sustrato es parcialmente bicatenario; la cadena que se encuentra totalmente hibridada presenta el

fluoróforo Cy5 en 5' para monitorizar la separación de cadenas, y la otra cadena contiene una ristra de Ts en 3' que constituye la región monocatenaria del oligo donde PcrA establece su interacción inicial. (B) Se empleó 6 nM de oligo sustrato y concentraciones crecientes de PcrA *Spn* (2,4, 60 y 90 nM). Las muestras correspondientes a los dos primeros pocillos no contuvieron enzima; la muestra del primer pocillo fue incubada durante 20 min a 37 °C, mientras que la del segundo pocillo fue incubada durante 5 min a 100 °C y enfriada rápidamente a 0 °C para conseguir la desnaturalización del DNA. Se observa que la incubación con PcrA *Spn* a 37 °C durante 20 min provoca la disminución del oligo parcialmente bicatenario Top3tailCy5-Bot3taildu y el correspondiente aumento del oligo monocatenario Top3tailCy5.

1. ENSAYOS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA

Para determinar si existe interacción entre RepB y PcrA *Spn* se realizaron ensayos de ultracentrifugación analítica (UA). A la hora de interpretar los resultados se debe tener en cuenta que PcrA *Spn* es susceptible de sufrir una proteólisis que da lugar a un producto N-terminal de 701 aa, referido como PcrAN, y a un producto C-terminal de 62 aa. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos mediante UA y en ambos casos se emplearon soluciones de proteína en Tris-HCl 20 mM pH 8,0 suplementado con 300 mM de NaCl y 1 mM de MgCl₂. En primer lugar se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación; en ellos se compararon los perfiles de soluciones que presentaban una sola de las proteínas con soluciones en las que RepB₆ y PcrA *Spn* coexistían (figura 40). En la tabla 12 se muestran las masas moleculares inferidas a partir de estos experimentos. La masa molecular promedio correspondiente a las soluciones que contienen RepB₆ y PcrA *Spn* simultáneamente es cercana a la media ponderada de las masas moleculares de ambas proteínas, lo que apunta a la inexistencia de interacciones entre ellas. El segundo tipo de experimento fue la determinación de la velocidad de sedimentación, tanto para soluciones individuales de RepB₆ y PcrA *Spn*, como para soluciones que contenían ambas proteínas simultáneamente. En la tabla 13 se detalla el perfil de especies obtenido para cada una de las soluciones analizadas; de nuevo no podemos deducir la existencia de interacciones entre RepB y PcrA *Spn* ya que no observamos la formación de especies con el coeficiente de sedimentación esperado que, en todo caso, sería mayor que el de las dos proteínas analizadas por separado. Además, los resultados de ambos tipos de experimentos parecen mostrar que PcrA *Spn* es en realidad su forma truncada PcrAN ya que los valores de masa molecular experimental son más próximos a aquellos teóricos que tienen en consideración a PcrAN que a los que tienen en consideración a la proteína entera PcrA *Spn*. También cabe destacar que en los dos tipos de experimento se observa un estado de oligomerización monomérico para PcrAN.

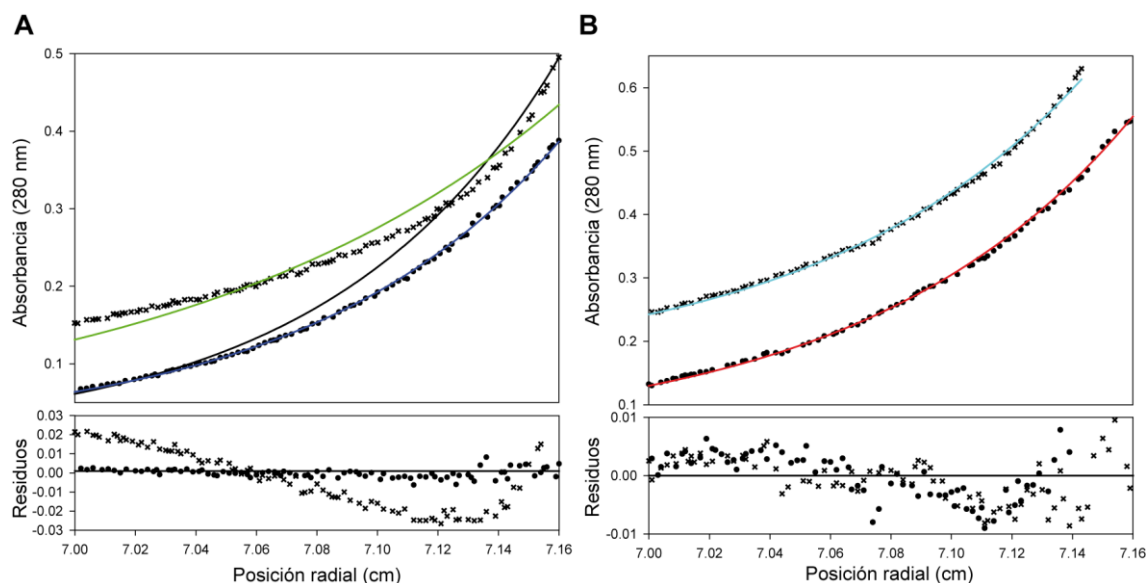


Figura 40. **Análisis de la interacción entre RepB₆ y la versión truncada de PcrA (PcrAN) por equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación analítica.** (A) Gradientes de RepB₆ (2 μM) y PcrA (2 μM) por equilibrio de sedimentación a 10.000 rpm y 20 °C. Los puntos negros y las cruces representan los datos experimentales de RepB₆ y PcrA respectivamente; la línea continua azul es el mejor ajuste de los datos experimentales de RepB₆ ($M_w=145.956\pm340$), mientras que la línea continua verde es el mejor ajuste a los datos de PcrAN ($M_w=74.266\pm3.972$). La línea continua negra es el gradiente teórico de un dímero de PcrAN (157.036). (B) Gradientes de las mezclas de RepB₆ y PcrAN por equilibrio de sedimentación a 10.000 rpm y 20 °C. Los puntos negros representan los datos experimentales de la mezcla de 2 μM de RepB₆ y 2 μM de PcrAN, de los que se obtuvo el mejor ajuste (línea continua roja; $M_w=126442\pm760$). Las cruces representan los datos experimentales de la mezcla de 2 μM de RepB₆ y 14 μM de PcrAN, de los que se obtuvo el mejor ajuste (línea continua azul; $M_w=126.442\pm1.064$).

Tabla 12. **Masas moleculares promedio de las especies proteicas en solución RepB₆ y PcrASpn, determinadas mediante ensayos de equilibrio de sedimentación.**

Proteínas	Masa molecular promedio experimental (Da)	Masa molecular teórica (Da) (en ausencia de interacción RepB ₆ -PcrA)
RepB ₆ (2 μM)	145.956±340	144726
PcrASpn (2 μM)	74.266±3.972	85.975 (monómero de PcrA) o 78.518 (monómero de PcrAN)
PcrASpn (14 μM)	73.453±480	85.975 (monómero de PcrA) o 78.518 (monómero de PcrAN)
RepB ₆ (2 μM) + PcrASpn (2 μM)	126.442±760	115.351 (RepB ₆ , PcrA) o 111.622 (RepB ₆ , PcrAN)
RepB ₆ (2 μM) + PcrASpn (14 μM)	86.835±1.064	93.319 (RepB ₆ , PcrA) o 86.794 (RepB ₆ , PcrAN)

Tabla 13. Detección de las especies correspondientes a RepB₆ y PcrASpn, así como a su mezcla, mediante ensayos de velocidad de sedimentación.

Proteínas	Especies y masa molecular estimada
RepB ₆ (2 µM)	6,3 S (96,6%); 142328 Da
	8,5 S (3,3%); 223279 Da
PcrASpn (4 µM)	1,5 S (17,8%); 15942 Da
	2,9 S (9,0%); 41761 Da
	4,6 S (73,3%); 80861 Da
RepB ₆ (2 µM) + PcrASpn (4 µM)	0,7 S (6,3%); 5058 Da
	2,5 S (9,8%); 37692 Da
	4,6 S (35,6%); 90771 Da
	6,3 S (45,5%); 146465 Da
	8,1 S (2,8%); 215840 Da

2. ENSAYOS DE SPR

La tecnología de ultracentrifugación analítica es capaz de detectar interacciones entre moléculas, inclusive aquellas de carácter muy débil. Aunque los experimentos descritos anteriormente nos reportan cierta garantía de que RepB₆ y PcrASpn no son capaces de interaccionar, nos interesaba conocer si ambas proteínas podían encontrarse próximas, formando parte de una hipotética maquinaria de replicación. Por ello realizamos ensayos de SPR, tal y como se explica en el apartado 29 de Métodos, empleando el oligo DDRtailb, que contiene las 3 DDRs y una región 3'-terminal monocatenaria para la unión de PcrASpn; adicionalmente, como todos los oligos destinados a ensayos de SPR, presenta una ristra de 6 T y una molécula de biotina, adyacentes a las DDRs (figura 41A, panel inferior y tabla 3).

Se realizaron ensayos de coinyección utilizando el oligo DDRtailb en los que primeramente se inyectó 0,06 µM de PcrASpn y seguidamente RepB₆ (0,018, 0,027, 0,04, 0,06 y 0,12 µM). El sensograma mostrado en el panel izquierdo superior de la figura 41A corresponde a este tipo de ensayo y refleja la formación de un complejo ternario DDRtailb-RepB₆-PcrASpn. Se observa un aumento de la señal hasta alcanzar unos 300 RU como resultado de la interacción de PcrASpn con el DNA, y un incremento adicional por la interacción de RepB₆ que varía en función de la concentración de esta proteína. Si bien es cierto que una vez terminada la inyección de PcrASpn se observa una pequeña disminución de la señal, sobre todo para las

menores concentraciones de RepB₆, la magnitud de dicha disminución refleja que únicamente una parte de las moléculas de PcrA*Spn* se disocia al inyectar RepB₆. También se realizaron ensayos de SPR para analizar la interacción entre el oligo DDRtailb y RepB₆ (figura 41A, panel superior, arriba a la derecha). Tanto en los ensayos de coinyección como en los ensayos en los que únicamente se inyectó RepB₆ el incremento de la señal resultante de la inyección de RepB₆ posee una magnitud similar, siendo levemente inferior en el caso de los ensayos de coinyección debido a la parcial disociación de PcrA*Spn* que ocurre en la coinyección.

En los ensayos de coinyección en los que se invirtió el orden de inyección de las proteínas, es decir primero RepB₆ y seguidamente PcrA*Spn*, se observa de nuevo la formación de un complejo ternario (figura 41A, panel superior, abajo a la izquierda).

Aunque en los ensayos de coinyección se detectó la formación del complejo ternario, cabía la posibilidad de que la segunda proteína interaccionara con la primera y no con el oligo. En este contexto se realizaron ensayos de coinyección empleando el oligo 1DDRb (figura 41B, panel inferior) en los que primeramente se inyectó RepB₆ y seguidamente PcrA*Spn*. Tanto la longitud como la estructura de 1DDRb no permiten la unión simultánea de ambas proteínas al oligo, por lo que la formación de un complejo ternario requeriría la interacción entre RepB₆ y PcrA*Spn*. Sin embargo no se observó complejo ternario con 1DDRb en estos ensayos (figura 41B), lo que sugiere que en el complejo ternario DDRtailb-RepB₆-PcrA*Spn* ambas proteínas estarían interaccionando simultáneamente con DDRtailb (figura 41A).

Si efectivamente PcrA*Spn* y RepB₆ interaccionan simultáneamente con el oligo DDRtailb deben encontrarse muy próximas entre sí, ya que la longitud del oligo es reducida. Se mantiene por lo tanto la hipótesis por la cual RepB y PcrA*Spn*, pese a no interaccionar específicamente, pueden permanecer juntas durante la replicación plasmídica.

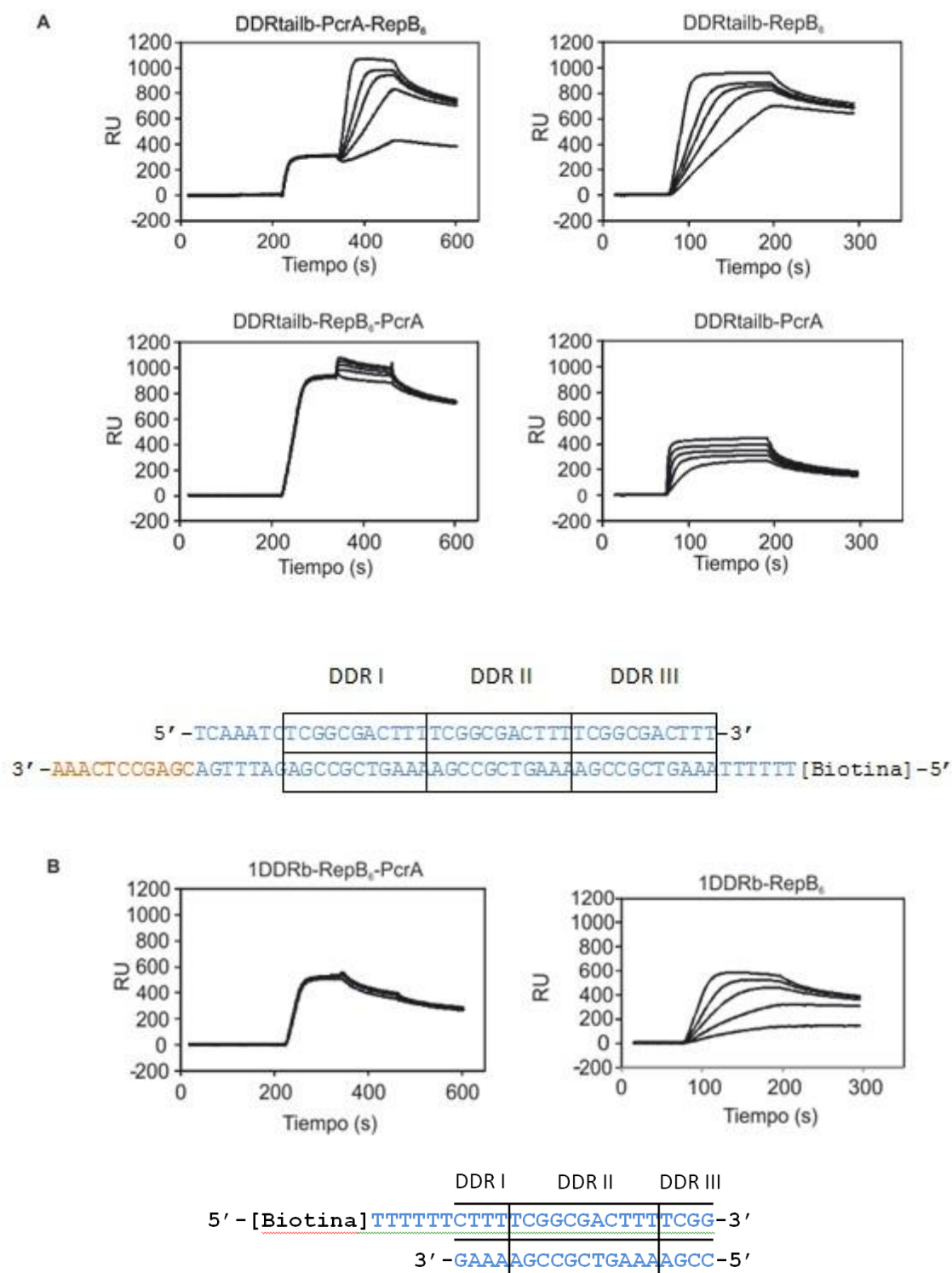


Figura 41. **Análisis de la interacción simultánea de PcrASpn y RepB₆ con los oligos DDRtailb y DDRb mediante SPR.** (A) Análisis de la interacción con DDRtailb. En el panel superior se muestran los siguientes sensogramas: 1) Arriba a la izquierda, coinyección para el oligo DDRtailb; en primer lugar se inyectó 0,06 μ M de PcrASpn y seguidamente RepB₆ (0,018, 0,027, 0,04, 0,06 y 0,12 μ M). 2) Arriba a la derecha, inyección de solo RepB₆ (0,018, 0,027, 0,04, 0,06 y 0,12 μ M) para la interacción con el oligo DDRtailb. 3) Abajo a la izquierda, coinyección para el oligo DDRtailb; en primer lugar se inyectó 0,06 μ M de RepB₆ y seguidamente PcrASpn (0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,48 μ M). 4) Abajo a la

Resultados - Estudio de la posible interacción entre RepB₆ y la helicasa PcrA

derecha, resultados con el oligo DDRtailb cuando únicamente se inyectó PcrASpn (0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,48 μ M). Panel inferior: esquema del oligo DDRtailb, que contiene las 3 DDRs y una región 3'-terminal monocatenaria para la unión de PcrASpn. (B) Análisis de la interacción con el oligo 1DDRb. En el panel superior se muestran los siguientes sensogramas: 1) A la izquierda, coinyección para el oligo DDRCb; en primer lugar se inyectó 0,06 μ M de RepB₆ y seguidamente PcrASpn (0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,48 μ M). 2) A la derecha, resultados con el oligo 1DDRb cuando únicamente se inyectó RepB₆ (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06 μ M). Panel inferior: esquema del oligo 1DDRb, que contiene la DDR central entera flanqueada por secuencias parciales de las DDRs adyacentes.

DISCUSIÓN

1. LAS INTERACCIONES DE RepB CON DISTINTOS ELEMENTOS DEL *dso* DE pMV158 TIENEN GRAN RELEVANCIA EN EL PROCESO REPLICATIVO

Las interacciones específicas entre RepB y los distintos elementos del *dso* de pMV158 no se limitan a conectar enzima y sustrato, sino que rigen los primeros pasos del mecanismo molecular que subyace a la replicación plasmídica. Existen indicios de que estas interacciones dirigen la oligomerización de RepB y promueven la extrusión de la estructura cruciforme IR-I de la región *nic*, otorgando a la secuencia de corte la conformación monocatenaria que requiere el sustrato de la actividad catalítica de RepB.

1.1. SITIOS DE UNIÓN PARA RepB EN EL *dso*

Debe tenerse en cuenta que la incapacidad de purificar la proteína entera en conformación monomérica nos llevó a realizar los ensayos de unión a DNA con el dominio OBD, con el objetivo de comprender cómo sucede la unión del monómero de RepB al DNA. Consideramos esta aproximación oportuna ya que el único responsable de la unión a DNA es el dominio OBD, cuya estructura es igual en el dominio aislado y en la proteína entera (figura 42). El hecho de que la afinidad de RepB₆ por 1 DDR sea superior a la de OBD, pese a ser este el único responsable de la unión específica a DNA, probablemente sea debido, tal y como se comentó en el primer capítulo de Resultados, al diferente estado de oligomerización, y no a las pequeñas diferencias estructurales que puedan existir entre el dominio OBD purificado separadamente y el dominio OBD que forma parte de la conformación hexamérica de RepB. La menor velocidad de disociación que refleja la etapa de disociación de los sensogramas de RepB₆/1DDRB en comparación con los de OBD/1DDRB (figura 11), y que parece ser la causa de la mayor afinidad de RepB₆ por 1DDR, podría deberse a que tras la disociación del DNA unido a uno de los protómeros del hexámero esa misma molécula de oligo se puede unir rápidamente al dominio OBD de un protómero contiguo dentro de la misma molécula de RepB₆. En cualquier caso, como se explicará más adelante, nuestro modelo prevé que son los monómeros de RepB los que interaccionan con los sitios de unión del *dso* en las primeras etapas de la iniciación de la replicación y que la oligomerización se produciría en segundo término, instigada por la interacción de los monómeros con las DDRs y PDRs. Por ello, sería la unión a DNA del protómero de OBD, y no la del hexámero RepB₆, la más representativa de lo que sucede en el comienzo del proceso replicativo de pMV158. Sin embargo, la extrapolación de los

resultados obtenidos para OBD a RepB no parece una aproximación apropiada a la hora de estudiar la cooperatividad de la unión de los diferentes monómeros de RepB a las DDRs, puesto que cabe esperar que, en caso de existir dicha cooperatividad, el dominio OD sea más susceptible de provocarla, ya que es el encargado de la oligomerización de la proteína.

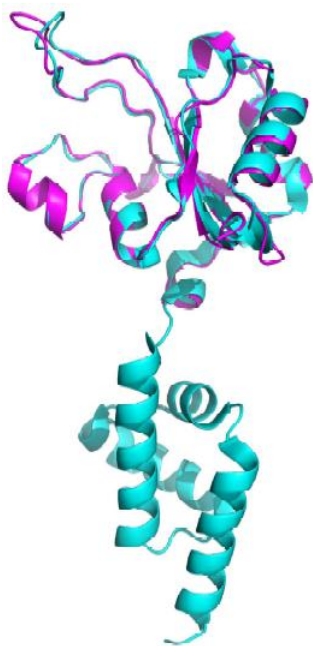


Figura 42. **Superposición de las estructuras de OBD y RepB.** El plegamiento global del OBD (rosa) es prácticamente idéntico al observado en la estructura de la proteína completa (azul), excepto por la zona del *bucle* entre las hebras β_2 y β_3 debido probablemente a la flexibilidad de esta región.

Previamente a este trabajo se consideraba que cada una de las PDRs del locus *nic* del *dso* podía constituir un sitio de unión para RepB, aunque ensayos de *footprinting* con la proteína hexamérica no mostraron un patrón repetido de contactos en ambas repeticiones (figura 43A), como sí ocurre, por el contrario, en las DDRs (figura 13). Los contactos principales entre RepB₆ y las PDRs se establecen con las dos Gs de la secuencia GAG localizada en la frontera entre ambas repeticiones, siendo así que dicha secuencia no se encuentra en el oligo 1PDR pero sí en 2PDR (figura 43B). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en este trabajo de tesis mediante EMSA (figura 10) y SPR, que han revelado que en realidad las 2 PDRs constituyen un único sitio de unión.



Figura 43. **Resumen de los contactos establecidos entre RepB₆ y la secuencia PDR del locus *nic*.** (A) Identificación de los contactos de RepB₆ con la secuencia del locus *nic* mediante ensayos de *footprinting* con radical hidroxilo y DMS sobre un fragmento de dsDNA lineal. Las secuencias PDR I y II están sombreadas. La repetición invertida IR-I se muestra con sus brazos derecho (D) e izquierdo (I), y la barra inclinada indica el sitio específico de corte por la proteína. (B) Secuencia de los oligos bicatenarios 1PDR y 2PDR empleados en los ensayos de EMSA. Al igual que en el panel (A), las secuencias PDR se muestran sombreadas.

Respecto a las DDRs, la caracterización de la interacción entre el dominio OBD y cada una de ellas reveló una afinidad idéntica para todas (figuras 10 y 11, y tablas 6 y 7), una vida media muy corta (figura 20), y la inexistencia de cooperatividad entre los eventos de unión de OBD a cada una de las DDRs (figura 21).

1.2. LAS REPETICIONES DIRECTAS DEL *dso* PODRÍAN DIRIGIR LA OLIGOMERIZACIÓN DE RepB Y LA SITUARÍAN EN EL LOCUS DONDE SE PRODUCE EL CORTE DEL DNA

Se ha observado que la replicación *in vivo* de pMV158 requiere la presencia de las DDRs, pese a que *in vitro* RepB es capaz de mediar la reacción de corte/cierre del DNA tanto en oligos monocatenarios que contienen únicamente la secuencia específica de corte, como en DNA superenrollado carente de las DDRs o con secuencias PDR y DDR distintas de las de pMV158 (Moscoso, del Solar et al. 1995). Uno de los objetivos de este trabajo es explicar por qué las DDRs resultan imprescindibles para la replicación de pMV158.

El hecho de que OBD presente mayor afinidad por cada una de las 3 DDRs que por el sitio de unión constituido por las 2 PDRs (figuras 10 y 11, y tablas 6 y 7) apunta a que *in vivo* RepB interaccionaría primero con las DDRs y a continuación con las PDRs. La unión de RepB al locus *bind* favorecería la interacción de la proteína con el locus *nic*. Si bien es cierto que en DNA lineal no se ha observado esta

cooperatividad positiva, en DNA superenrollado la unión del hexámero RepB₆ al locus *nic* sucede a concentraciones de proteína más bajas cuando el locus *bind* está presente en la misma molécula de DNA (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007). Para comprender la cooperatividad entre los eventos de unión a los locus *bind* y *nic* hay que tener en consideración que, a diferencia de los plásmidos de las familias de pT181 y pC194, cuyas regiones *nic* y *bind* se encuentran adyacentes, pMV158 presenta una separación entre ambos loci de 58 pb. La secuencia de DNA situada entre las PDRs y las DDRs presenta una región rica en pares de bases A-T, conservada en otros plásmidos de la familia, a la que podrían unirse proteínas arquitecturales que reconocen el DNA distorsionado, favoreciendo así el acercamiento de los sitios primario y secundario de unión para RepB. De hecho, algunas Ts de la cadena no-codificante de esta región presentan una marcada reactividad al KMnO₄ en DNA superenrollado con independencia de la unión de RepB, lo que es indicativo de una región de DNA realmente distorsionada (Ruiz-Masó, Lurz et al. 2007). Por otro lado, los resultados de este trabajo apuntan a que la posición relativa de los loci *bind* y *nic*, más que la distancia entre ambos, tiene relevancia en la replicación de pMV158, resultando imprescindible la conservación de la fase para que se pueda iniciar el proceso replicativo (figura 22).

Quizás DDRs y PDRs se unan a los protómeros de RepB posicionándolos convenientemente para su oligomerización, de manera que la interacción con el *dso* constituya un proceso secuencial y dinámico que resulte en la hexamerización de RepB. Un proceso similar se ha postulado en la iniciación de la replicación de algunos virus de DNA como el papilomavirus, el virus asociado a adenovirus (AAV) o SV40, cuyas proteínas iniciadoras E1, Rep y antígeno-T grande, respectivamente, son helicasas de la superfamilia SF3 que forman anillos hexaméricos (James, Escalante et al. 2003, Enemark and Joshua-Tor 2006). Cabe destacar el caso del ensamblaje del hexámero de Rep de AAV, ya que el origen de replicación de este virus tiene algunas analogías con el de pMV158. El genoma de AAV2 es una molécula de ssDNA lineal que replica por el mecanismo denominado *rolling hairpin*, caracterizado por la presencia de repeticiones invertidas en los extremos, que se pliegan para formar estructuras secundarias. Los extremos de AAV2 poseen unas repeticiones invertidas terminales denominadas ITRs, que sirven como orígenes para la replicación del DNA. Cada ITR contiene secuencias palindrómicas interrumpidas que permiten la formación de tres regiones de DNA bicadena. Contenidas en estas ITRs se encuentran dos secuencias requeridas para la replicación: el sitio de unión para Rep (RBS), consistente en varias repeticiones directas (5'-GCTC-3'), y el sitio de resolución

terminal, trs, donde la proteína Rep corta el DNA viral. Parece ser que la unión de varios monómeros de Rep al RBS a través del dominio N-terminal, que es el responsable de la unión a DNA y de la actividad enzimática, da lugar al ensamblaje del hexámero (figura 44).

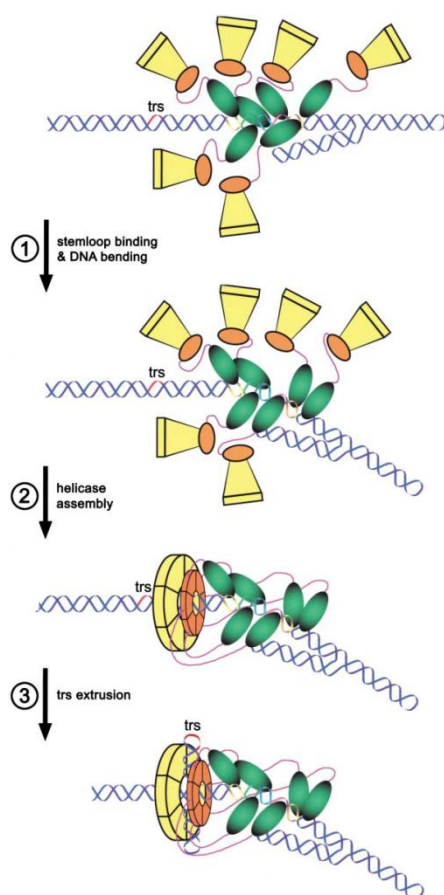
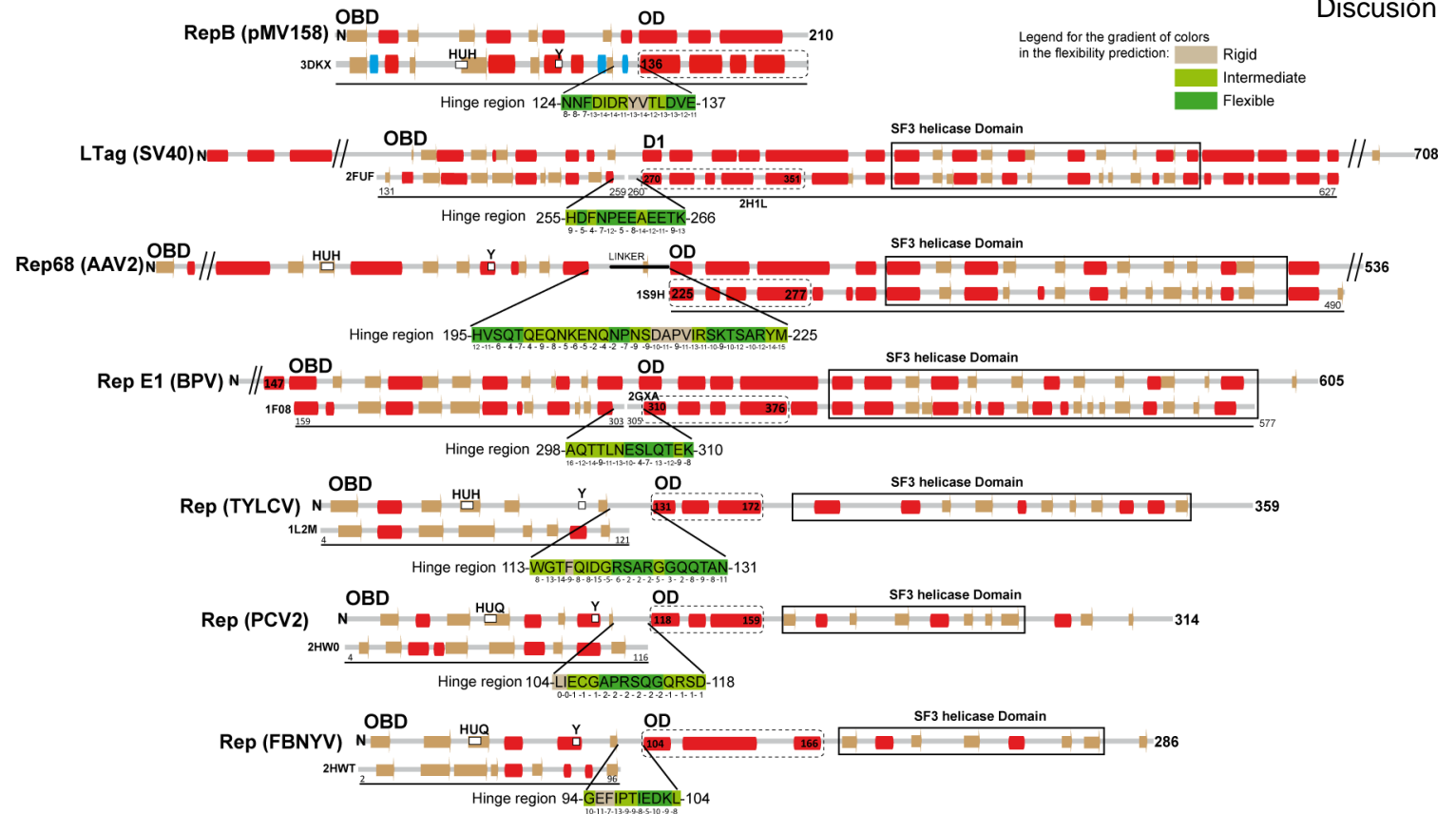


Figura 44. **Modelo del ensamblaje de la Rep de AAV.** Paso 1) seis dominios N-terminales de Rep (verde) se unen a las repeticiones del RBS y adicionalmente uno de ellos se une al brazo de una de las horquillas terminales. Paso 2) la unión de los monómeros de Rep a RBS da lugar al ensamblaje de los otros dominios de Rep (amarillo y naranja) formándose así el hexámero. Paso 3) la actividad helicasa da lugar al sustrato trs monocatenario, que será cortado por Rep. Figura extraída de (Hickman, Ronning et al. 2004).

En el modelo de AAV parece fundamental la existencia de una región flexible entre el dominio N-terminal y el resto de la proteína. Volviendo al caso de pMV158, en el hipotético ensamblaje de RepB articulado por el *dso* resultaría de gran relevancia la libertad de movimiento de los OBDs respecto a los ODs, reportada por la región bisagra que los conecta, que favorecería la correcta orientación de los ODs involucrados en el ensamblaje del hexámero, una vez los dominios OBD se hubieran unido al DNA. Cabe mencionar que la arquitectura OBD-bisagra-OD parece ser importante en proteínas Rep que adoptan conformación hexamérica. Dado el parecido entre RepB e iniciadores Rep de origen viral, se comparó tanto la composición de dominios como la flexibilidad entre los mismos en varias de estas proteínas (figura 45), observándose una región no estructurada de 10-31 residuos entre OBD y OD en todas las analizadas, que además sería considerablemente flexible según el servidor PredyFlexy (de Brevern, Bornot et al. 2012). La presencia de una región no

estructurada que actuaría como bisagra queda demostrada en algunas de estas proteínas Rep virales cuya estructura ha sido resuelta (Rep de AAV2, Rep E1 de BPV y LTag de SV40) (Boer, Ruiz-Masó et al. 2016).

Figura 45. **Análisis comparativo de la estructura secundaria predicha u observada de los dominios (hipotéticos o definidos) de RepB y de las proteínas Rep de virus.** Para cada proteína analizada se indica el extremo amino (N) y el número de aminoácidos. La línea horizontal en la parte superior de la secuencia indica el resultado de la predicción de estructura secundaria (hélices α y cadenas β representadas por barras rojas y marrones, respectivamente). La línea horizontal en la parte inferior indica la estructura secundaria observada para los fragmentos de proteína cuya estructura está disponible (hélices α , cadenas β y hélices 3_{10}



representadas por barras rojas, marrones y azules, respectivamente). En los mapas de proteína se indican tanto los aminoácidos conservados del centro activo implicados en la unión del metal (HUH) y en la actividad endonucleolítica, como los límites de los dominios OBD, OD (confirmado o potencial, pOD) y helicasa. Para RepB, Rep de AAV2, E1 y LTag, la estructura secundaria de los ODs observada en las estructuras cristalinas se muestra debajo de la predicción de estructura secundaria y precedida del código PDB. Puesto que la estructura del OBD de las proteínas Rep de AAV2 y TGMV no está disponible, se indican los límites del extremo carboxilo de dicho dominio que están definidos por el alineamiento con las familias de proteína Pfam PF08724 y PF00799, respectivamente. Los dominios helicasa de FBNNY y PCV2 están definidos por el alineamiento con la familia Pfam PF00910 de helicasas SF3. Para cada proteína analizada se indica la secuencia y coordenadas de la región intermedia entre los dominios OBD y OD, que constituye un posible dominio bisagra. La flexibilidad de cada residuo de la región bisagra, estimada con el servidor PredyFlexy, se representa mediante un gradiente de colores donde el color gris indica un residuo rígido, y los colores verde y verde oscuro indican residuos con flexibilidad intermedia o alta, respectivamente. El índice de confianza, que refleja la fiabilidad de la predicción de flexibilidad, se representa por valores discretos que aumentan con la confianza de la predicción desde 1 hasta 19. Estos valores están indicados para cada aminoácido debajo de la secuencia. Imagen extraída de (Boer, Ruiz-Masó et al. 2016).

1.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS INTERACCIONES ENTRE RepB Y DDR

La caracterización de las interacciones entre RepB y DDR se ha llevado a cabo mediante las siguientes aproximaciones experimentales: ensayos de *footprinting* con radical hidroxilo y DMS (figura 13), análisis de mutantes afectados en la capacidad de unión al DNA específico del locus *bind* (figura 16), y resolución de la estructura cristalina del complejo proteína-DNA formado entre dos moléculas de OBD y una molécula de un oligo con 2 DDRs (figura 15). Todas estas aproximaciones mostraron resultados congruentes. Los elementos de RepB6 implicados en la unión a DNA, que ocurre por el surco mayor, son la hélice $\alpha 2$, el extremo N-terminal y los bucles entre la hélice $\alpha 2$ y la hebra $\beta 4$ y entre la hebra $\beta 3$ y la hélice $\alpha 2$. Los residuos que participan con seguridad en la interacción son: K3 y K5 localizados en el extremo N-terminal; T67 en $\beta 3$; D69, S70, R72, K73, K74 y K76 en $\alpha 2$; M86, V87 y Q88 en el bucle entre $\alpha 2$ y $\beta 4$. Los contactos se establecen con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA a excepción de D69, que interacciona con el nitrógeno N4 de la segunda C de cada DDR. El residuo K3 también parece establecer interacciones específicas con las guaninas cercanas, aunque la resolución de sólo 3 Å de la estructura del co-cristal impide determinar con claridad los detalles de la interacción. Se observa que el centro activo queda alejado de la molécula de DNA en la estructura del complejo (figura 15), aunque es necesario recordar que dicha estructura muestra la unión entre OBD y la secuencia DDR, que es independiente de la actividad enzimática. El protómero responsable del corte del DNA podría establecer interacciones diferentes con el DNA.

2. ACTIVIDAD ENDONUCLEOLÍTICA, FORMACIÓN DE ADUCTO COVALENTE Y ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA DE CADENA SON LAS CARACTERÍSTICAS ENZIMÁTICAS DE RepB QUE POSIBILITAN LA REPLICACIÓN DE pMV158

Conocer las características y requerimientos de la actividad enzimática de RepB nos puede ayudar a profundizar en el conocimiento del mecanismo de replicación de pMV158. A continuación se mencionan algunos aspectos fundamentales referentes a RepB y a la replicación de pMV158 que han resultado de gran relevancia a la hora de establecer muchos de los objetivos de esta tesis. En el inicio de la replicación, la actividad endonucleolítica de RepB requiere que la secuencia de corte se encuentre en conformación monocatenaria, por lo que es necesaria la extrusión de la estructura cruciforme IR-I. Tras el corte, la proteína debe

quedar unida covalentemente al extremo 5' dejando el extremo 3'-OH libre. Este aducto covalente formado en el inicio es fundamental para la terminación de la replicación de la cadena líder, ya que, además de permitir el traslado del extremo 5' del DNA parental junto con la horquilla de replicación, actúa como electrófilo en la reacción de transferencia de cadena (Moscoso, del Solar et al. 1995).

2.1. RepB POSEE APARENTEMENTE DOS RESIDUOS CATALÍTICOS, Y99 Y H102, Y AMBOS SON CAPACES DE FORMAR ADUCTO COVALENTE

Previamente a este trabajo se pensaba que el único residuo catalítico de RepB era la Y99, y que el aducto covalente proteína-DNA, si bien era necesario, debía ser muy lábil, ya que no se había podido detectar directamente (Moscoso, del Solar et al. 1995). Sin embargo, como se describe a continuación, ambas hipótesis parecen ser incorrectas.

En primer lugar, hemos sido capaces, finalmente, de detectar el aducto (figura 25) y su estudio ha revelado una considerable estabilidad. Concretamente, se ha observado una mayor presencia del aducto covalente en unas condiciones de reacción de tiempos cortos, temperaturas bajas y pH ácido (figura 27). Ensayos de actividad con oligos monocatenarios han revelado que, conforme avanza el tiempo, el aducto covalente en parte da lugar al producto de transferencia de cadena y en parte es hidrolizado irreversiblemente, siendo el fragmento de DNA liberado un producto que se acumula por no poder emplearse como sustrato en la reacción de transferencia de cadena.

Por otro lado, se ha observado que el mutante con la Y99 catalítica sustituida por A presenta cierta actividad enzimática y es capaz de formar un aducto covalente (figura 24), lo que muestra que Y99 no es el único residuo catalítico de RepB. El análisis de la actividad enzimática de varios mutantes con sustituciones en el centro activo parece apuntar a que el segundo residuo catalítico es H102, ya que el doble mutante $OBD^{Y99H102A}$ pierde totalmente la actividad enzimática (figura 28A y tabla 10). Si bien es cierto que esta ausencia de actividad enzimática podría deberse a modificaciones en la configuración del centro activo, consecuencia de la introducción de las dos mutaciones, los resultados expuestos a continuación encajan con el potencial papel catalítico de H102. Por un lado, los mutantes individuales OBD^{H102A} y OBD^{Y99A} conservan una actividad enzimática considerable, aunque severamente disminuida, y por otro lado se observa cierta actividad en los mutantes dobles en los

que, además de sustituir uno de los dos supuestos residuos catalíticos, se sustituyó otro residuo del entorno del centro activo (OBD^{H102K112A}, OBD^{Y99Y115A} y OBD^{Y99Y14A}) (figura 28). La aparente mayor estabilidad del aducto covalente formado por Y99 respecto al formado por H102 sustenta la hipótesis por la cual Y99 podría ser el residuo involucrado en la iniciación, mientras que H102 lo sería en la terminación. En la iniciación resultaría más ventajoso un aducto estable que no se hidrolizara durante la etapa posterior de elongación, mientras que en la terminación, un aducto inestable entre la proteína y el extremo 5' de la cadena recién sintetizada del producto bicatenario sufriría hidrólisis y la mella generada podría ser ligada por la ligasa bacteriana (figura 48). Otra vía que igualmente daría como resultado una molécula bicatenaria circular sería que el aducto covalente generado en la etapa de terminación sufriera un ataque nucleofílico por parte del extremo 3'-OH de la cadena de nueva síntesis. Sin embargo, nos decantamos por la vía de la hidrólisis, puesto que el aducto covalente constituido por H102 parece tener un carácter más inestable y porque, además, la proteína es incapaz de catalizar la transferencia de cadena a un extremo 3'-OH en conformación bicatenaria (resultados recientes obtenidos en el laboratorio). Adicionalmente, el residuo H102 podría estar involucrado en la desprotonación de Y99, favoreciendo el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el mutante carente de H102 tiene la actividad más afectada que el carente de Y99 (figura 28), y en que la posición y orientación de H102, situada a 4,8 o 4,2 Å (dependiendo del protómero) de Y99, son adecuadas para ello. Cabe mencionar que en algunas relaxasas se ha observado que el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster llevado a cabo por el residuo catalítico se encuentra apoyado por la participación de uno o varios residuos H cercanos. Por ejemplo, en el caso de la endonucleasa de restricción Bfil, la H catalítica de una subunidad cataliza el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster, mientras que la H catalítica de la otra subunidad protona el grupo hidroxilo saliente (Sasnauskas, Zakrys et al. 2010). Otro ejemplo sería la recombinasa Flp, en la que dos residuos H participan en el correcto posicionamiento y en la activación de la Y catalítica (Grainge, Lee et al. 2001).

Respecto a Y115, se ha observado que el mutante OBD^{Y115A} presenta una reducción de los niveles de hidrólisis del aducto (figura 28A y tabla 10), lo que sugiere que dicho residuo podría mediar esta reacción. Ya que existe un puente de hidrógeno entre Y115 y D42 (figura 6B), podría suceder que D42 desprotonara a Y115 favoreciendo que Y115 a su vez desprotonara a una molécula de agua que actuaría, así, como nucleófilo sobre el enlace covalente en la reacción de hidrólisis del aducto.

El hecho de que el mutante OBD^{D42A} muestre una ligera disminución de los niveles de hidrólisis respecto a lo observado para OBD, mientras que el doble mutante OBD^{D42Y115A} presente unos niveles de hidrólisis mucho más reducidos (figura 28A y tabla 10) apoyaría esta hipótesis. Sin embargo, Y115 no se encuentra cerca de Y99, por lo que la participación de Y115 en la hidrólisis del aducto formado con Y99 quedaría en entredicho. Por el contrario, Y115 sí se encuentra cercana a H102 (4,5 Å), lo que explicaría la mayor labilidad del aducto formado con H102 en comparación con el aducto formado con Y99. En cualquier caso, el residuo Y115 no parece ser el único implicado en la hidrólisis, que sigue sucediendo aunque dicho residuo sea sustituido por A.

2.2. EL CATIÓN Mn^{2+} FORMA PARTE DEL CENTRO ACTIVO, ESTABILIZA LA ESTRUCTURA DE OBD Y RepB₆ Y PODRÍA TENER VARIOS PAPELES EN LA REPLICACIÓN DE pMV158

Los cationes divalentes metálicos parecen tener gran relevancia en la actividad de RepB. Además de formar parte del centro activo (figura 46) y participar en la reacción enzimática, podrían estar involucrados en el correcto posicionamiento del ssDNA sustrato en la cavidad catalítica, mediante la neutralización de cargas del DNA.

El análisis del patrón de bandas de los productos de reacción de OBD y RepB₆ sobre oligos monocatenarios ha revelado que en el caso del hexámero RepB₆ se pierde la prioridad por la actividad de transferencia de cadena a altas concentraciones de Mn^{2+} , mientras que para OBD no se observan variaciones en el patrón de bandas al aumentar la concentración de catión a los mismos niveles y, de hecho, este patrón es muy similar al observado para RepB₆ a elevadas concentraciones de catión (figura 26A). Podría suceder que a altas concentraciones de Mn^{2+} , y del mismo modo de Mg^{2+} , el catión divalente se uniera al DNA neutralizándolo y en consecuencia deteriorando las interacciones con la proteína responsables de situar próximos los sustratos para la reacción de transferencia de cadena. En el caso de OBD, la ausencia del OD y la consecuente incapacidad para la hexamerización podrían afectar a las interacciones que se establecen entre la proteína y los sustratos de la reacción y que facilitan la transferencia de cadena, lo que justificaría que altas concentraciones de catión no conlleven las variaciones de patrón de productos que se observan en las reacciones catalizadas por RepB₆.

Curiosamente, y a pesar de la elevada afinidad de la unión entre Mn^{2+} y RepB₆, no observamos apenas actividad enzimática a concentraciones de catión para las que cabría esperar la saturación del sitio de unión al catión en el centro activo en base a los resultados de afinidad obtenidos por ITC (figura 36). Sin embargo, esta aparente discrepancia no existe en el caso del mutante OBD^{D42A} y se encuentra muy atenuada para OBD (figura 35). Este hecho podría deberse a la existencia de otros sitios de unión a metal que se encontraran en el hexámero RepB₆ pero no en OBD. Curiosamente, se ha detectado la existencia de un segundo sitio de unión a metal de baja afinidad, cuya función es desconocida hasta el momento, formado por el esqueleto peptídico de la región bisagra de un protómero y las cadenas laterales de residuos del dominio OD del mismo protómero y el de otro adyacente (Boer, Ruiz-Masó et al. 2016).

En referencia a la estabilización de la estructura de RepB, la unión a Mn^{2+} supone una fuerte estabilización térmica, tanto para el dominio OBD como para RepB₆, que se correlaciona con la saturación de un sitio de alta afinidad para el catión localizado en cada protómero, según el análisis por ITC. Este sitio de alta afinidad debe ser el localizado en el centro activo de la proteína, ya que la sustitución de uno de los ligandos del metal (D42) en dicho centro provoca una disminución tanto de la afinidad por Mn^{2+} como del efecto de termoestabilización producido por el catión divalente (figura 35). Otros cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) no son capaces de estabilizar a la proteína frente a la desnaturalización térmica. Pese a que también se ha observado estabilización térmica inducida por unión a metal en algunas endonucleasas HUH de la clase Mob (Xia and Robertus 2009, Lorenzo-Díaz, Dostál et al. 2011), la estabilización de la proteína, a iguales concentraciones de catión, es significativamente inferior a la observada en el caso de RepB. El importante efecto protector sobre la estructura de RepB proporcionado por la unión de Mn^{2+} probablemente sea debido a la estabilización tanto de los residuos ligandos del catión en el centro activo (H39, D42, H55 y H57), como de las esferas de coordinación de dichos residuos (figura 46). Tres de estos ligandos se encuentran unidos mediante enlaces de hidrógeno. Concretamente las cadenas principales de H39 e H55 se encuentran conectadas mediante dos enlaces de hidrógeno, mientras que el grupo carboxilo de D42 establece enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de H55 y Y115. Además, la cadena lateral de H39 forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de la L100, y el grupo carbonílico de D42 se une a través de un enlace de hidrógeno a la cadena principal de S44, cuyo grupo hidroxilo está a su vez conectado con la cadena principal de K50. Adicionalmente, H57 y S36 establecen tres enlaces de

hidrógeno entre sus cadenas principales y laterales. El catión Mn^{2+} , al estabilizar esta red de contactos polares, contribuye también a mantener la posición tanto del lazo (21 residuos) entre las hebras $\beta 2$ y $\beta 3$, como de la región comprendida entre la hélice $\alpha 3$ y la hélice $3_{10} \eta 2$ (figura 46; (Boer, Ruiz-Maso et al. 2009). En cuanto al residuo D42, si bien es cierto que no es esencial para la unión del catión, contribuye significativamente a la elevada afinidad de la proteína por este. La conformación global del centro activo y su entorno debe estar alterada en el caso del mutante OBD^{D42A} , ya que este residuo es muy importante para mantener la arquitectura de la cavidad catalítica. Cabe destacar que el residuo Y115, unido a través de un enlace de hidrógeno a D42, se encuentra conservado en las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pMV158.

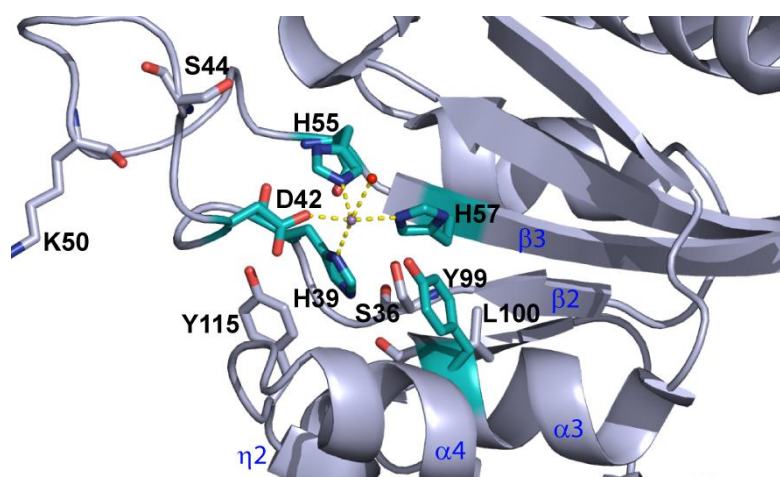


Figura 46. **Detalle de la cavidad catalítica de la estructura atómica de RepB.** Se indican los residuos ligandos del catión metálico (H39, D42, H55 y H57), así como los residuos que interaccionan mediante enlaces de hidrógeno con estos ligandos. Todos ellos forman una red de contactos polares.

3. LA CONFORMACIÓN MONOMÉRICA DE RepB PODRÍA INICIAR LA REPLICACIÓN, MIENTRAS QUE LA HEXAMÉRICA PARECE ESTAR INVOLUCRADA EN EL DESPLAZAMIENTO DE LA CADENA LÍDER Y QUIZÁS CONSTITUYA LA ESPECIE INACTIVA UNA VEZ FINALIZADA LA REPLICACIÓN

El estado de oligomerización hexamérico de RepB obtenido de la purificación a partir del sistema de expresión en *E. coli* no se da en ninguna de las otras proteínas Rep de plásmidos RCR caracterizadas hasta el momento, aunque sí se observa en otros casos tales como la Rep del virus AAV-5, donde la unión de seis monómeros de

proteína a su sitio específico de unión, constituido por cinco repeticiones directas de cuatro pares de bases, conduce al ensamblaje de los dominios helicasa C-terminales para formar un anillo hexamérico (Hickman, Ronning et al. 2004). Cabe esperar que la forma hexamérica de RepB sea funcional en algún momento del proceso replicativo.

3.1.LA CONFORMACIÓN HEXAMÉRICA DE RepB PODRÍA SER RELEVANTE EN LA ACTIVIDAD HELICASA DURANTE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA

La actividad helicasa sobre el dsDNA plasmídico es necesaria para desplazar la cadena líder después del corte inicial, tanto en RCR como en conjugación. En el caso de la replicación RC de fagos y plásmidos, la actividad helicasa está proporcionada por el huésped. Por ejemplo, las helicasas Rep y UvrD de *E. coli* están implicadas en la replicación de bacteriófagos de cadena sencilla (como Φ X174) y de plásmidos RC, respectivamente (Bruand and Ehrlich, 2000; Takahashi *et al.*, 1978). En bacterias Gram-positivas se ha observado que la helicasa PcrA interacciona con los iniciadores plasmídicos RCR (Chang *et al.*, 2002). Existen discrepancias acerca del estado de oligomerización de PcrA y UvrD; algunos autores sugieren que son monoméricas mientras otros han observado que únicamente son activas como dímero (Ruiz-Masó, Machón et al. 2015). La participación de helicasas en el replisoma de plásmidos que replican por RC ha sido ampliamente estudiada. La interacción física entre PcrA_{Sau} y la proteína iniciadora de la replicación RepC, codificada por pT181, se ha postulado como esencial para la iniciación de la replicación RC del plásmido (Ruiz-Masó, Anand et al. 2006). Del mismo modo, PcrA de *B. stearothermophilus* es reclutada en el origen de replicación plasmídico a través de la interacción directa con la proteína iniciadora RepD, codificada por pC221, habiendo sido detectado el complejo ternario oriD-RepD-PcrA_{Sau} (Machón, Lynch et al. 2010). Respecto a las implicaciones en la actividad helicasa, se ha observado que RepC aumenta considerablemente la procesividad de PcrA en *B. stearothermophilus* (Soultanas, Dillingham et al. 1999). Adicionalmente se ha observado que PcrA de *B. stearothermophilus* es capaz de separar proteínas unidas al DNA que impedirían la replicación, tales como RecA (Park, Myong et al. 2010).

La estructura de RepB₆ conforma un anillo cuyo canal, definido por las hélices $\alpha 8$, posee un diámetro de 13-20 Å y presenta un carácter electropositivo (figura 7), lo que lo convierte en una región capaz de unir DNA, aunque por sus dimensiones únicamente podría albergar ssDNA. En el contexto del proceso replicativo, esta

estructura en forma de anillo puede suponer una ventaja en la etapa de la elongación; una de las cadenas del plásmido a replicar podría pasar por el canal, favoreciéndose así el desplazamiento de la cadena líder. Esta suposición se ve respaldada por la similitud estructural entre RepB₆ y otros sistemas, como el de la helicasa E1 del papillomavirus (Enemark and Joshua-Tor 2006) o el antígeno T del SV40 (VanLoock, Alexandrov et al. 2002), en los que el ssDNA ocupa el canal central de la proteína hexamérica (figura 47). Sin embargo, RepB, al igual que otras proteínas iniciadoras de RCR de plásmidos y bacteriófagos, no presenta ni actividad ATPasa ni helicasa, y aunque la DNA polimerasa III podría actuar como “motor” del replisoma, tal y como nos ha sugerido el Prof. Luis Blanco, resulta muy aventurado proponer que la replicación de pMV158 no precisa de una helicasa bacteriana, en tanto en cuanto no hayamos comprobado este punto. En cualquier caso sí parece que los requerimientos de pMV158 en cuanto a la posible actividad helicasa aportada por el huésped son más permisivos en comparación con otros plásmidos RCR. Los trabajos realizados por Iordanescu en *S. aureus* mostraron que un mutante del gen *pcrA*, denominado *pcrA3*, producía una fuerte disminución del número de copias del plásmido pT181 y la acumulación de formas de DNA circulares abiertas, como consecuencia del corte mediado por RepC en el origen de replicación plasmídico (Iordanescu and Basheer 1991). Este mutante de PcrA posee un cambio puntual (T61I) en el motivo conservado la y, como consecuencia, presenta baja hidrólisis de ATP y reducida actividad helicasa. Contrariamente a lo que sucede con pT181, en el caso de pMV158, al igual que en el de pC194, dicha mutación no impide la replicación plasmídica. La replicación de pMV158 en un fondo *pcrA3* podría deberse a la participación de RepB en la actividad helicasa al favorecer el desplazamiento de la cadena líder, lo que incrementaría la procesividad de la helicasa bacteriana o, en última instancia, volvería a la proteína del huésped dispensable para el proceso replicativo del plásmido. Por otra parte, los resultados de este trabajo reflejan que no se establecen interacciones intermoleculares entre RepB y PcrA_{Spn}, pero que ambas proteínas pueden unirse simultáneamente a DNA una junto a la otra (figura 41). Cabe la posibilidad de que PcrA empuje a RepB durante la etapa de elongación de la replicación sin necesidad de interacciones específicas proteína-proteína, lo que aumentaría la diversidad de helicasas aptas para la replicación de pMV158, justificando, al menos en parte, la elevada promiscuidad del sistema.

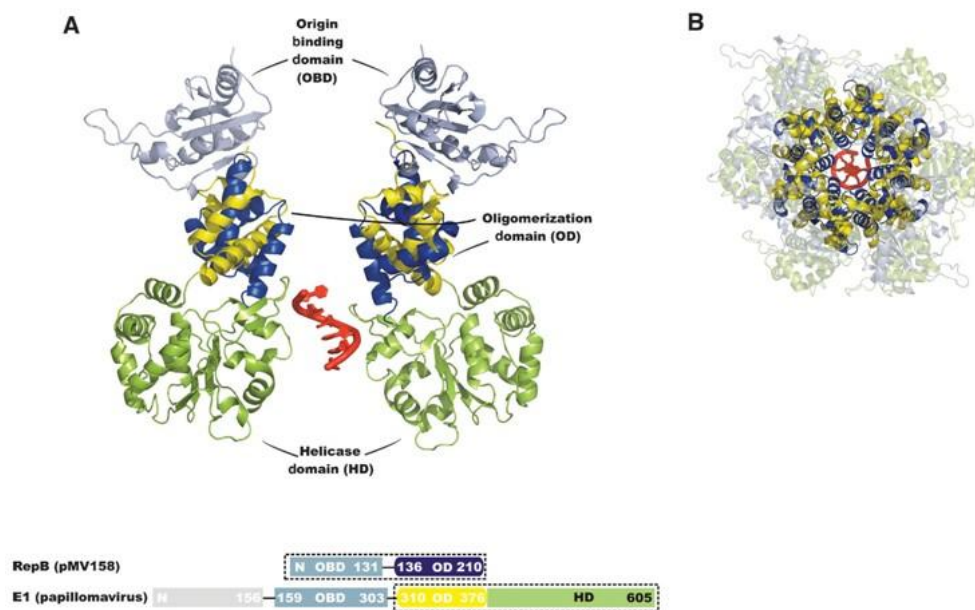


Figura 47. **Comparación de las estructuras de la helicasa E1 de papilomavirus y RepB₆.** (A) Superposición de dos monómeros flanqueantes del canal de los hexámeros de RepB y E1. En rojo se muestra el ssDNA en el canal de E1. El diagrama inferior representa la organización de los dominios de ambas proteínas; remarcados con línea discontinua se muestran los dominios representados en la estructura siguiendo el mismo código de colores. (B) Vista superior de la superposición de los hexámeros de ambas proteínas, donde se indican con transparencias el dominio helicasa de E1 (en un plano inferior) y el OBD de RepB (plano superior). Imagen modificada de (Boer, Ruiz-Maso et al. 2009).

3.2. EL INICIO DE LA REPLICACIÓN PODRÍA REQUERIR LA FORMA MONOMÉRICA DE RepB, MIENTRAS QUE EN LA TERMINACIÓN RepB SE LIBERARÍA COMO HEXÁMERO, CONFORMACIÓN INCAPAZ DE INICIAR UNA NUEVA RONDA DE REPLICACIÓN

En la replicación RC de plásmidos bacterianos, a diferencia de lo que sucede en virus, es necesario que la proteína de iniciación quede inactivada y liberada de la molécula de DNA tras una única ronda de replicación para que el control de la replicación plasmídica sea efectivo; de nada serviría la regulación de la síntesis de Rep, si luego esta puede actuar ilimitadamente. Entre las diferentes estrategias para conseguir este objetivo cabe destacar la seguida por pT181, en la que la forma dimérica de RepC es inactivada al quedar la tirosina catalítica de uno de los protómeros unida a un pequeño fragmento de ssDNA, siendo esta forma RepC/RepC* capaz de unirse al DNA, pero no de promover la extrusión de la estructura cruciforme (Jin, Zhou et al. 1996) y, por tanto, de iniciar una nueva replicación. Esta no parece ser la estrategia seguida por RepB, puesto que no se ha podido detectar la presencia de aductos RepB* en células de neumococos portadoras de pMV158 (recientes resultados del laboratorio).

En el caso de RepB, existen indicios de que el hexámero es la especie inactiva. *In vitro*, el hexámero RepB₆ media la reacción de corte/cierre del DNA en oligos monocatenarios, así como en DNA superenrollado, que resulta relajado tras el proceso. Sin embargo, no es capaz de iniciar una replicación productiva, como se ha comprobado en ensayos de replicación *in vitro* en los que se adicionaba la proteína pura. A diferencia de RepB₆, OBD puede cortar pero no sellar el DNA superenrollado (recientes resultados del laboratorio), lo que podría deberse a la incapacidad de OBD para mantener próximos y en configuración monocatenaria los extremos de la cadena de DNA cortada. Así, la acción de la proteína hexamérica sobre el DNA superenrollado daría lugar a iniciaciones abortivas que generarían un DNA plasmídico relajado, en tanto que OBD podría generar el aducto requerido para una iniciación productiva. La información anterior suscitó la hipótesis de que es la conformación monomérica de RepB, y no la hexamérica, la que inicia la replicación de pMV158. Asimismo, acorde con esta hipótesis, proponemos que el ensamblaje del hexámero sería posterior al corte y que la extrusión de la estructura cruciforme, que debe producirse con anterioridad al corte, no sería promovida por la forma hexamérica, sino por un protómero u otro estado de oligomerización intermedio.

4. MODELO PARA LA REPLICACIÓN DE pMV158

La recapitulación de lo explicado en los anteriores puntos nos ha llevado a proponer el modelo descrito a continuación (figura 48). En él se cumplen los requerimientos definidos en la Introducción para la replicación plasmídica por RC (figura 3) y se muestran las peculiaridades propias del sistema de replicación de pMV158.

En la etapa de iniciación del proceso replicativo se produciría el reconocimiento del *dso* por parte de protómeros o estados intermedios de oligomerización de RepB. En primer lugar ocurriría la unión a las DDRs (que podría estar facilitada por la interacción entre los ODs de distintos protómeros) y a continuación a las PDRs. La interacción de la proteína, aún sin hexamerizar, con el locus *nic* promovería la extrusión de la estructura cruciforme IR-I. Dicha estructura reporta conformación monocatenaria a la secuencia de corte, requisito imprescindible para la actividad endonucleolítica de RepB. La hexamerización de RepB sería facilitada por la proximidad de las moléculas de RepB unidas a los diferentes elementos del *dso*, por la

distorsión del DNA que dicha unión provoca, y por la permisibilidad de orientación de los distintos dominios OBD, en complejo con regiones diversas del origen, con respecto al anillo de simetría senaria formado por los ODs. La generación de interacciones fuertes entre los protómeros de RepB que conforman el hexámero, a través de los ODs, podría debilitar las interacciones previas proteína-DNA, y conseguir que el anillo hexamérico se estableciera englobando una de las hebras parentales de pMV158, de modo similar a lo postulado para el ensamblaje de E1, que es promovido por la unión específica de dímeros a una secuencia palindrómica de 18 pb situada en el origen viral, el cual contiene múltiples secuencias de unión superpuestas para E1. El modelo para E1 propone que conforme avanza el proceso de ensamblaje del anillo hexamérico se reduce la dependencia de las interacciones con el DNA y son las interacciones entre moléculas de E1 las que ganan protagonismo (Chen and Stenlund 2002). Volviendo al caso de pMV158, el corte en el inicio de la replicación se produciría previamente a la hexamerización y, como consecuencia, uno de los protómeros del hexámero ensamblado de RepB quedaría unido covalentemente, a través de la Y99 del OBD, al extremo 5' de la cadena parental cortada, la cual sería simultáneamente englobada en el canal central de la proteína. Este enlace covalente debería mantenerse hasta alcanzar la etapa de terminación, ya que es necesario para la reacción de transferencia de cadena que conducirá a la liberación del intermedio replicativo de ssDNA circular. El hecho de que uno de los protómeros del hexámero se encuentre unido covalentemente al extremo 5' de la cadena cortada podría implicar, al "tirar" la proteína del DNA, la formación de una región monocatenaria donde se cargarían las proteínas del replisoma, entre ellas la DNA polimerasa. Durante la etapa de la elongación, RepB₆ se desplazaría junto con el resto de proteínas del replisoma. La DNA polimerasa III sintetizaría la cadena nueva (Khan 1997), utilizando como *primer* el extremo 3'-OH libre resultante del corte. Seguramente la helicasa del huésped también forma parte de este replisoma, encargándose de separar las cadenas del plásmido sustrato en colaboración con RepB₆. Sin embargo, no se establecerían interacciones restrictivas entre RepB y la helicasa, por lo que diversas helicasas podrían desempeñar este papel, hecho que aportaría al sistema amplitud de rango de huésped. Otras proteínas del huésped participantes del proceso replicativo serían las SSB, responsables de impedir el reanillamiento de la cadena desplazada (Stillman 1994). Finalizada la elongación, se produce la etapa de terminación, cuyos pasos se describen a continuación. El segundo residuo catalítico, H102, cortaría en el sitio de corte reconstituido entre la cadena parental y la recién sintetizada. Para que se produzca la reacción de transferencia de cadena que sella los extremos de la cadena parental desplazada, el segundo residuo catalítico debería pertenecer al mismo

protómero que realizó el corte iniciador. Esto podría estar facilitado por el apareamiento de bases entre los extremos de la cadena parental (IR-I), el 5' de los cuales está unido covalentemente a la Y99. Como esa Y está “ocupada” con el aducto, no puede ejercer el ataque nucleofílico, que se llevaría a cabo por la H102 vecina. Si fuera otro protómero distinto el que realizara el corte de la terminación, no tendría por qué estar favorecida la acción de H102 frente a la de Y99, y los dos extremos del DNA a sellar estarían alejados, lo que dificultaría la reacción de transferencia de cadena. El extremo 3'-OH, generado tras el corte de la H102, atacaría nucleofílicamente al aducto covalente (formado a través de la Y99) en la reacción de transferencia de cadena, liberándose en consecuencia una molécula monocatenaria recircularizada. La conversión de esta molécula monocatenaria a dsDNA se produciría mediante la síntesis de la cadena retrasada a partir del origen de replicación de cadena sencilla (sso), por acción de las enzimas del huésped RNA polimerasa, DNA polimerasa I, y DNA polimerasa III. Seguidamente la ligasa del huésped sellaría los extremos de la molécula de dsDNA resultante. En esta segunda reacción de corte, RepB₆ quedaría unida covalentemente a través de H102 a la cadena recién sintetizada. Llegado este punto, podría producirse de nuevo una reacción de transferencia de cadena que generaría una molécula de DNA bicatenaria cerrada, o alternatively podría producirse una hidrólisis del aducto y la mella resultante sería cerrada por la ligasa del huésped. Esta segunda opción es la que consideramos más factible ya que la proteína es incapaz de catalizar la transferencia de cadena a un extremo 3'-OH en conformación bicatenaria. Además, la hidrólisis evitaría la posibilidad de que se produjera una nueva ronda de replicación al cortar Y99 en el sitio de corte recién reconstituido, tal y como sucede en el sistema de replicación del fago ΦX174, que posee dos Ys catalíticas que inician alternativamente sucesivos ciclos de replicación (Noirot-Gros and Ehrlich 1996). Adicionalmente, la presencia de una discontinuidad en la cadena de DNA de nueva síntesis permitiría la liberación de la proteína en forma hexamérica y, por tanto, inactiva para iniciar un nuevo proceso de replicación, hecho imprescindible para mantener el número de copias característico del plásmido en la bacteria. El hexámero RepB₆ podría participar en el control del número de copias de otro modo adicional; ya que RepB₆ se une más fuertemente al locus *bind* del *dso* que OBD, podría suceder que el hexámero inactivo liberado interaccionara con el *dso* de otras moléculas de pMV158 impidiendo su replicación. Finalmente la enzima DNA girasa del huésped daría lugar a la forma superenrollada de los plásmidos producto (Ruiz-Masó, Machón et al. 2015).

Este modelo sería extrapolable a todos los replicones de la familia de pMV158, para cuyas proteínas Rep se predicen características similares en cuanto a dominios constituyentes y flexibilidad entre dominios. Puesto que esta familia de plásmidos presenta una gran promiscuidad, pudiendo así reportar resistencia a antibióticos a un amplio rango de huéspedes, el estudio de las características replicativas de pMV158 nos parece interesante, no sólo por el propio conocimiento del mecanismo, sino también desde un punto de vista clínico (Ruiz-Masó, Machón et al. 2015). El mecanismo de replicación propuesto relaciona la promiscuidad de la familia de pMV158 con las características de la proteína Rep, que presenta una conformación hexamérica singular entre las proteínas iniciadoras de RCR de plásmidos y bacteriófagos, semejante a la que forman las proteínas Rep de virus de animales y plantas.

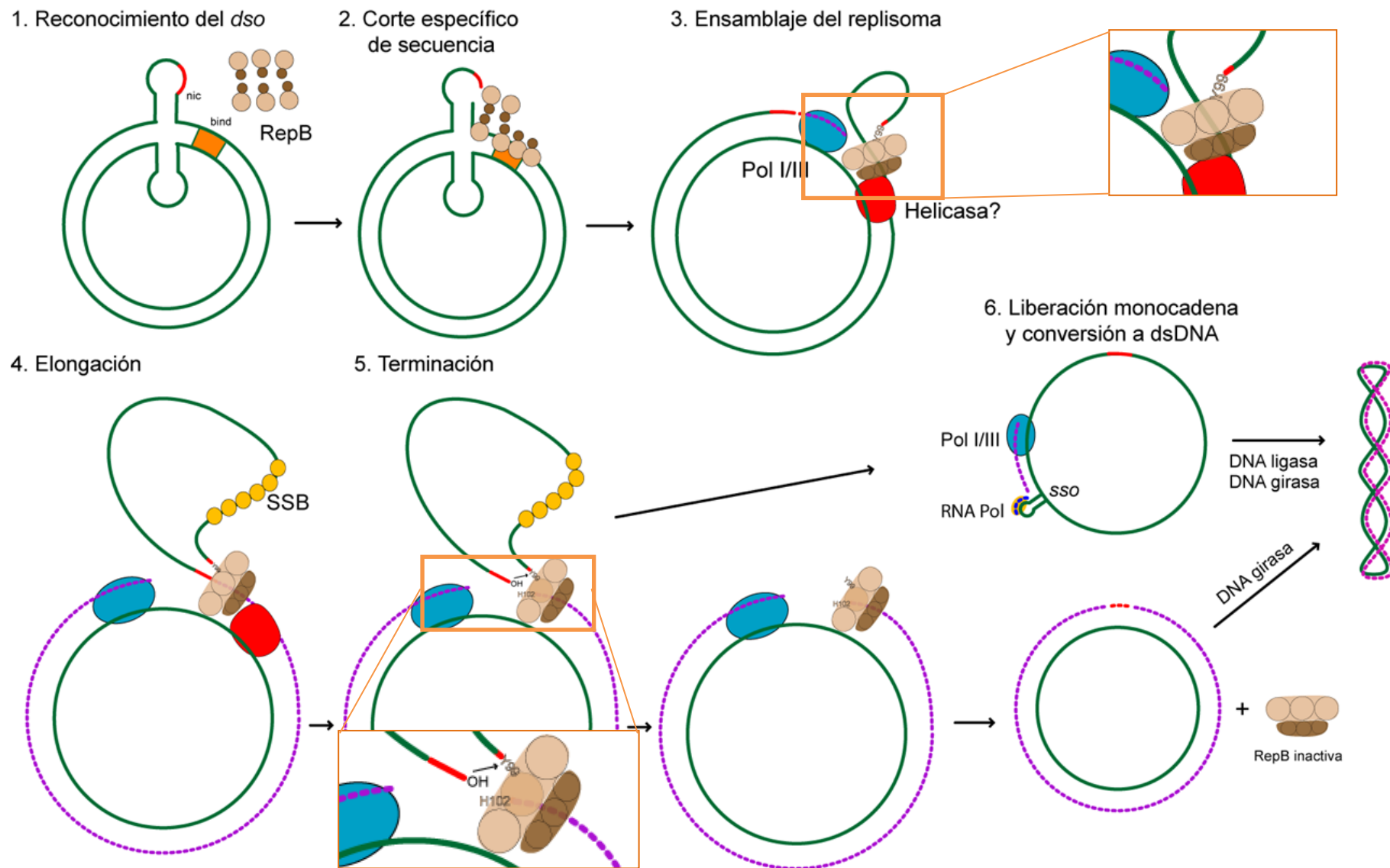


Figura 48. **Modelo para la replicación de pMV158.** En la **etapa de iniciación** se produce el reconocimiento del *dso* por parte de protómeros o estados intermedios de oligomerización de RepB, sucediéndose primero la unión a las DDRs y después a las PDRs. La interacción de la proteína, aun no ensamblada como hexámero, con el locus *nic* promovería la extrusión de la estructura cruciforme IR-I, quedando la secuencia de corte en conformación monocatenaria. La proteína cortaría mediante el residuo catalítico Y99 y quedaría unida covalentemente a través de dicho residuo al extremo 5' de la cadena parental cortada. A continuación se ensamblaría el hexámero, englobando la cadena cortada en el canal resultante. Durante la **etapa de la elongación** las DNA polimerasas del huésped sintetizarían la nueva cadena utilizando el extremo 3'-OH libre resultante del corte como primer, mientras la helicasa del huésped separaría las cadenas parentales del plásmido en colaboración con RepB₆. DNA polimerasa III, helicasa y RepB se encontrarían agrupadas constituyendo el replisoma. Por su parte, las proteínas SSB impedirían el reanillamiento de la cadena desplazada. Finalizada la elongación, se produce la **etapa de terminación**. El segundo residuo catalítico, H102, del mismo protómero cortaría en el sitio de corte reconstituido entre la cadena parental y la recién sintetizada. El extremo 3'-OH generado atacaría nucleofílicamente al aducto covalente en la reacción de transferencia de cadena, liberándose en consecuencia una molécula monocatenaria recircularizada, cuya conversión a dsDNA se produciría mediante la síntesis de la cadena retrasada a partir del origen de replicación de cadena sencilla (*sso*), por acción de las enzimas del huésped RNA polimerasa, DNA polimerasa I, y DNA polimerasa III, y seguidamente la ligasa del huésped sellaría los extremos de la molécula de dsDNA resultante. Por otro lado, RepB₆ quedaría unida covalentemente a través de H102 a la cadena recién sintetizada. La hidrólisis de este segundo aducto covalente permitiría la liberación de la proteína en forma hexamérica, que es inactiva para iniciar una nueva replicación. La ligasa del huésped sellaría los extremos de la molécula de dsDNA. Finalmente la DNA girasa del huésped daría lugar a la forma superenrollada de los plásmidos producto.

CONCLUSIONES

1. El *dso* de pMV158 está constituido por dos loci, *nic* y *bind*. El locus *bind*, compuesto por tres repeticiones directas (DDRs), es el sitio de unión primario de RepB. El locus *nic*, compuesto por la repetición invertida IR-I, con la secuencia específica de corte en la parte central, y dos repeticiones directas (PDRs), constituye el sitio secundario de unión de RepB. Respecto a la interacción de RepB con las repeticiones directas, las dos PDRs constituyen un único elemento de unión, y la afinidad que muestra la proteína por estas es inferior a la mostrada por cada una de las 3 DDRs, para las cuales RepB muestra idéntica afinidad. Por otra parte, la vida media del complejo formado entre el dominio de RepB responsable de la unión a DNA, OBD, y una DDR es muy corta, inferior a 10 s.
2. La posición relativa entre DDRs y PDRs es fundamental para la replicación de pMV158, quizás debido a que la unión de RepB al *dso* podría dirigir el ensamblaje de la proteína.
3. Probablemente la interacción de RepB con las PDRs promueva que la repetición invertida IR-I adopte la conformación de estructura cruciforme. Dicha conformación incrementa la afinidad de la proteína por esta región.
4. El dominio OBD de RepB es el encargado de la unión a DNA y se encuentra como monómero en solución debido a que el único responsable de la oligomerización es el dominio OD. Ya que las estructuras cristalinas de RepB₆ y OBD reflejan que el plegamiento de OBD es prácticamente idéntico en ambos casos, hemos podido obtener información de la interacción entre RepB y DNA a través del análisis de la interacción entre OBD y DNA. Sin embargo, la presencia del dominio OD podría conllevar la existencia de cooperatividad, por interacción entre dominios OD de diferentes protómeros, en el evento de unión de RepB a las DDRs, pese a que la unión de OBD a las tres DDRs no presenta cooperatividad.
5. La resolución de la estructura del complejo proteína-DNA formado entre dos moléculas de OBD y una molécula de un oligo con 2 DDRs ha revelado que los residuos del OBD que participan en la unión al locus *bind* son: K3 y K5 localizados en el extremo N-terminal; T67 en el bucle

entre $\beta 3$ y $\alpha 2$; D69, S70, R72, K73, K74 y K76 en $\alpha 2$, y M86, V87 y Q88 en el bucle entre $\alpha 2$ y $\beta 4$. El análisis de la interacción con una DDR de formas mutantes de OBD con sustituciones de residuos relevantes para la capacidad de unión a DNA ha mostrado resultados congruentes con la estructura cristalográfica del complejo proteína-DNA.

6. En el inicio de la replicación de pMV158, tras el corte por parte de RepB, esta debe quedar unida covalentemente al extremo 5', ya que resulta imprescindible para la terminación de la replicación de la cadena líder. Este aducto covalente proteína-DNA ha sido detectado. También hemos observado que el aducto sufre una hidrólisis irreversible, que parece verse favorecida al aumentar tanto la temperatura como el pH, y que podría tener un papel fundamental en la terminación de la replicación de la cadena líder, evitando que la proteína inicie una nueva ronda de replicación.
7. RepB presenta un segundo residuo catalítico, adicional a Y99. Este segundo residuo parece ser H102, ya que el doble mutante OBD^{Y99H102A} pierde completamente la actividad enzimática. Además de ser el segundo residuo catalítico, H102 podrían estar involucrado en la desprotonación de Y99, favoreciendo el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster en el inicio de la replicación.
8. La desnaturalización térmica de RepB₆ consta de dos pasos irreversibles. La proteína sufre una primera transición térmica irreversible a una temperatura de 32-45 °C, tras la cual se vuelve propensa a la auto-asociación, y cuando se alcanzan los 80 °C tiene lugar la segunda transición. La primera transición térmica de RepB₆ afecta concretamente al dominio OBD.
9. El catión del centro activo de RepB proporciona a la proteína una fuerte estabilización térmica frente a la primera transición. Este importante efecto protector parece ser debido a la estabilización tanto de los residuos ligandos del catión en el centro activo como de las esferas de coordinación de dichos residuos.

10. El residuo D42 tiene gran relevancia en la unión del catión metálico al centro activo, ya que el mutante OBD^{D42A} presenta una afinidad por Mn²⁺ muy deteriorada así como una menor termoestabilización por el ion metálico.
11. Proponemos que los cationes divalentes metálicos están involucrados en el correcto posicionamiento del ssDNA sustrato en la cavidad catalítica de RepB, mediante la neutralización de cargas del DNA.
12. Aunque no se ha observado interacción entre RepB y PcrA^{Spn}, ambas proteínas pueden unirse simultáneamente a DNA una junto a la otra. Cabe la posibilidad de que PcrA empuje a RepB durante la etapa de elongación de la replicación sin necesidad de interacciones proteína-proteína, lo que aumentaría promiscuidad del sistema.
13. El estado de oligomerización hexamérico de RepB es único entre las proteínas Rep de plásmidos RCR caracterizadas hasta el momento, y la asemeja a proteínas iniciadoras de la replicación de pequeños virus de animales y plantas. La conformación hexamérica de RepB puede suponer una ventaja en la etapa de la elongación, ya que presenta un canal por el cual podría pasar una de las cadenas del plásmido a replicar, favoreciéndose así el desplazamiento de la cadena líder. Por otra parte, en la replicación RC de plásmidos bacterianos, a diferencia de lo que sucede en virus, es necesario que la proteína de iniciación quede inactivada y liberada de la molécula de DNA tras una única ronda de replicación para que el control de la replicación plasmídica sea efectivo. Ya que la conformación hexamérica de RepB es incapaz de iniciar una replicación productiva, parece ser esta la especie inactiva de RepB.

BIBLIOGRAFÍA

- Anand, S. P. and S. A. Khan (2004). "Structure-specific DNA binding and bipolar helicase activities of PcrA." Nucl. Acids Res. **32**(10): 3190-3197.
- Andrade, M. A., P. Chacón, J. J. Merelo and F. Morán (1993). "Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network." Prot. Eng. **6**: 383-390
- Asano, S., A. Higashitani and K. Horiuchi (1999). "Filamentous phage replication initiator protein gpII forms a covalent complex with the 5' end of the nick it introduced." Nucl. Acids Res. **27**(8): 1882-1889.
- Backert, S., K. Meibner and T. Borner (1997). "Unique features of the mitochondrial rolling circle-plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.)." Nucl. Acids Res. **25**: 582-589.
- Birboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523.
- Boer, D. R., J. A. Ruiz-Masó, J. R. Gomez-Blanco, A. G. Blanco, M. Vives-Llàcer, P. Chacón, I. Usón, F. X. Gomis-Ruth, M. Espinosa, O. Llorca, G. Del Solar and M. Coll (2009). "Plasmid replication initiator RepB forms a hexamer reminiscent of ring helicases and has mobile nuclease domains." EMBO J **28**: 1666-1678.
- Boer, D. R., J. A. Ruiz-Masó, J. R. Lopez-Blanco, A. G. Blanco, M. Vives-Llaser, P. Chacon, I. Uson, F. X. Gomis-Ruth, M. Espinosa, O. Llorca, G. del Solar and M. Coll (2009). "Plasmid replication initiator RepB forms a hexamer reminiscent of ring helicases and has mobile nuclease domains." EMBO J **28**(11): 1666-1678.
- Boer, D. R., J. A. Ruiz-Masó, M. Rueda, M. V. Petoukhov, C. Machón, D. I. Svergun, M. Orozco, G. del Solar and M. Coll (2016). "Conformational plasticity of RepB, the replication initiator protein of promiscuous streptococcal plasmid pMV158." Scientific Reports **6**: 20915.
- Böhm, G., R. Muhr and R. Jaenicke (1992). "Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks." Protein Eng **5**: 194-195.
- Bruand, C., S. D. Ehrlich and L. Janniere (1991). "Unidirectional replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAM β 1." EMBO J **10**: 2171-2177.
- Bruand, C., E. Le Chatelier, S. D. Ehrlich and L. Janniere (1993). "A fourth class of theta replicating plasmid: the pAM β 1 family from Gram-positive bacteria." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 11668-11672.
- Burdett, V. (1980). "Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B)." Antimicrob. Agents Chemother. **18**(5): 753-760.
- Carr, S. B., S. E. Phillips and C. D. Thomas (2016). "Structures of replication initiation proteins from staphylococcal antibiotic resistance plasmids reveal protein asymmetry and flexibility are necessary for replication." Nucleic Acids Res **44**(5): 2417-2428.

Chandler, M., F. de la Cruz, F. Dyda, A. B. Hickman, G. Moncalian and B. Ton-Hoang (2013). "Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily." Nat Rev Microbiol **11**(8): 525-538.

Chang, T.-L., A. Naqvi, S. P. Anand, M. G. Kramer, R. Munshi and S. A. Khan (2002). "Biochemical characterization of the *Staphylococcus aureus* PcrA helicase and its role in plasmid rolling circle replication." J. Biol. Chem. **277**(48): 45880-45886.

Chen, G. and A. Stenlund (2002). "Sequential and ordered assembly of E1 initiator complexes on the papillomavirus origin of DNA replication generates progressive structural changes related to melting." Mol Cell Biol **22**(21): 7712-7720.

de Brevern, A. G., A. Bornot, P. Craveur, C. Etchebest and J. C. Gelly (2012). "PredyFlexy: flexibility and local structure prediction from sequence." Nucleic Acids Res **40**(Web Server issue): 317-322.

Debenjak, J. A. (2014). Estudio de las proteínas de la partícula regulatoria del proteosoma y del ensamblaje de la lid y Análisis estructural del dominio OBD de RepB y su unión al ADN, Universidad de Barcelona.

del Solar, G., R. Diaz and M. Espinosa (1987). "Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **206**(3): 428-435.

del Solar, G. and M. Espinosa (2000). "Plasmid copy number control: an ever-growing story." Mol Microbiol **37**(3): 492-500.

del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarria, M. Espinosa and R. Diaz-Orejas (1998). "Replication and control of circular bacterial plasmids." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 434-464.

del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa and R. Díaz-Orejas (1998). "Replication and control of circular bacterial plasmids." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 434-464.

del Solar, G., M. Moscoso and M. Espinosa (1993). "*In vivo* definition of the functional origin of replication (ori(+)) of the promiscuous plasmid pLS1." Mol. Gen. Genet. **237**: 65-72.

del Solar, G., M. Moscoso and M. Espinosa (1993). "Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and -negative bacteria: a wall falls." Mol. Microbiol. **8**: 789-796.

del Solar, G., M. Moscoso and M. Espinosa (1993). "Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and gram-negative bacteria: a wall falls." Mol Microbiol **8**(5): 789-796.

del Solar, G. H., J. Pérez-Martín and M. Espinosa (1990). "Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from repAB promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element." J. Biol. Chem. **265**(21): 12569-12575.

del Solar, G. H., A. Puyet and M. Espinosa (1987). "Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1." Nucleic Acids Research **15**(14): 5561-5580.

Dempsey, L. A., P. Birch and S. A. Khan (1992). "Six amino acids determine the sequence-specific DNA binding and replication specificity of the initiator proteins of the pT181 family." J. Biol. Chem. **267**: 24538-24543.

Díaz, A., S. A. Lacks and P. López (1994). "Multiple roles for DNA polymerase I in establishment and replication of the promiscuous plasmid pLS1." Mol. Microbiol. **14**: 773-783.

Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-6145.

Enemark, E. J., G. Chen, D. E. Vaughn, A. Stenlund and L. Joshua-Tor (2000). "Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus." Molecular Cell **6**(1): 149.

Enemark, E. J. and L. Joshua-Tor (2006). "Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase." Nature **442**(7100): 270.

Espinosa, M., S. Cohen, M. Couturier, G. del Solar, R. Díaz-Orejas, R. Giraldo, L. Jánniere, M. Osborn and C. M. Thomas (2000). Plasmid replication and copy number control. The horizontal gene pool. Bacterial plasmids and gene spread. C. M. Thomas. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 1-48.

Grainge, I., J. Lee, C. J. Xu and M. Jayaram (2001). "DNA recombination and RNA cleavage activities of the Fip protein: roles of two histidine residues in the orientation and activation of the nucleophile for strand cleavage." J Mol Biol **314**(4): 717-733.

Gruss, A. D., and S. D. Ehrlich. (1989). "The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids." Microbiol. Rev. **53**: 231-241.

Hanahan, D. (1983). "Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**: 557-580.

Hernández-Arriaga, A. M., T. S. Rubio-Lepe, M. Espinosa and G. del Solar (2009). "Repressor CopG prevents access of RNA polymerase to promoter and actively dissociates open complexes." Nucl. Acids Res. **37**(14): 4799-4811.

Hickman, A. B., D. R. Ronning, Z. N. Perez, R. M. Kotin and F. Dyda (2004). "The nuclease domain of adeno-associated virus Rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces." Molecular Cell **13**(3): 403.

Holmes, M. L., F. Pfeifer and M. L. Dyll-Smith (1995). "Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon." Gene **153**(1): 117-121.

- Ilyina, T. V. and E. V. Koonin (1992). "Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes, and archaebacteria." Nucl. Acids Res. **20**: 3279-3285.
- Iordanescu, S. (1993). "Characterization of the *Staphylococcus aureus* chromosomal gene *pcrA*, identified by mutations affecting plasmid pT181 replication." Mol. Gen. Genet. **241**: 185-192.
- Iordanescu, S. and R. Basheer (1991). "The *Staphylococcus aureus* mutation *pcrA3* leads to the accumulation of pT181 replication initiation complexes." J. Mol. Biol. **221**: 1183-1189.
- Jain, A. and P. Srivastava (2013). "Broad host range plasmids." FEMS Microbiol Lett **348**(2): 87-96.
- James, J. A., C. R. Escalante, M. Yoon-Robarts, T. A. Edwards, R. M. Linden and A. K. Aggarwal (2003). "Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2." Structure **11**(8): 1025.
- Jin, R. and R. P. Novick (2001). "Role of the double-strand origin cruciform in pT181 replication." Plasmid **46**: 95–105.
- Jin, R., A. Rasooly and R. P. Novick (1997). "*In vitro* inhibitory activity of RepC/C*, the inactivated form of the pT181 plasmid initiation protein, RepC." J. Bacteriol. **179**: 141-147.
- Jin, R., X. Zhou and R. P. Novick (1996). "The Inactive pT181 initiator heterodimer, RepC/C, binds but fails to induce melting of the plasmid replication origin." J. Biol. Chem. **271**(49): 31086-31091.
- Khan, S. A. (1997). "Rolling-circle replication of bacterial plasmids." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**(4): 442-455.
- Khan, S. A. (2005). "Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research." Plasmid **53**(2): 126-136.
- Kiewiet, R., S. Bron, K. de Jonge, G. Venema and J. F. M. L. Seegers (1993). "Theta replication of the lactococcal plasmid pWVO2." Mol. Microbiol. **10**: 319-327.
- Kim, S. W., E. J. Jeong, H. S. Kang, J. I. Tak, W. Y. Bang, J. B. Heo, J. Y. Jeong, G. M. Yoon, H. Y. Kang and J. D. Bahk (2006). "Role of RepB in the replication of plasmid pJB01 isolated from *Enterococcus faecium* JC1." Plasmid **55**: 99-113.
- Koepsel, R. R., R. W. Murray, W. D. Rosenblum and S. A. Khan (1985). "The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**(20): 6845-6849.

- Kramer, M. G., M. Espinosa, T. K. Misra and S. A. Khan (1999). "Characterization of a single-strand origin, ssoU, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids." Mol Microbiol **33**(3): 466-475.
- Krupovic, M., S. A. Ghabrial, D. Jiang and A. Varsani (2016). "Genomoviridae: a new family of widespread single-stranded DNA viruses." Archives of Virology **161**(9): 2633-2643.
- Lacks, S. (1966). "Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation." Genetics **53**(1): 207-235.
- Lacks, S. and B. Greenberg (1977). "Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation." J Mol Biol **114**(1): 153-168.
- Lacks, S. A. (1966). "Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation." Genetics **53**: 207-235.
- López-Aguilar, C., C. Romero-Lopez, M. Espinosa, A. Berzal-Herranz and G. Del Solar (2015). "The 5'-tail of antisense RNAII of pMV158 plays a critical role in binding to the target mRNA and in translation inhibition of repB." Front Genet **6**: 225.
- Lorenzo-Díaz, F., L. Dostál, M. Coll, J. F. Schildbach, M. Menéndez and M. Espinosa (2011). "The MobM relaxase domain of plasmid pMV158: thermal stability and activity upon Mn²⁺ and specific DNA binding." Nucl. Acids Res. **39**(10): 4315-4329.
- Machón, C., G. P. Lynch, N. H. Thomson, D. J. Scott, C. D. Thomas and P. Soultanas (2010). "RepD-mediated recruitment of PcrA helicase at the *Staphylococcus aureus* pC221 plasmid replication origin, oriD." Nucleic Acids Research **38**(6): 1874-1888.
- Majumder, S. and R. P. Novick (1988). "Intermediates in plasmid pT181 DNA replication." Nucleic Acids Res **16**(7): 2897-2912.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Marsin, S. and P. Forterre (1999). "The active site of the rolling circle replication protein Rep75 is involved in site-specific nuclease, ligase and nucleotidyl transferase activities." Molecular Microbiology **33**(3): 537-545.
- Meijer, W. J. J., A. J. de Boer, S. van Tongeren, G. Venema and S. Bron (1995). "Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon." Nucleic Acids Res. **23**: 3214-3223.
- Moscoso, M., G. del Solar and M. Espinosa (1995). "*In vitro* recognition of the replication origin of pLS1 and of plasmids of the pLS1 family by the RepB initiator protein." J. Bacteriol. **177**(24): 7041-7049.

Moscoso, M., G. del Solar and M. Espinosa (1995). "Specific nicking-closing activity of the initiator of replication protein RepB of plasmid pMV158 on supercoiled or single-stranded DNA." J. Biol. Chem. **270**(8): 3772-3779.

Moscoso, M., R. Eritja and M. Espinosa (1997). "Initiation of replication of plasmid pMV158: mechanisms of DNA strand-transfer reactions mediated by the initiator RepB protein." J. Mol. Biol. **268**(5): 840.

Müller, A. K., F. Rojo and J. C. Alonso (1995). "The level of the pUB110 replication initiator protein is autoregulated, which provides an additional control for plasmid copy number." Nucl. Acids Res. **23**: 1894-1900.

Nesvera, J., J. Hochmannova and M. Patek (1998). "An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*." FEMS Microbiol Lett **169**(2): 391-395.

Noirot-Gros, M.-F., V. Bidnenko and S. D. Ehrlich (1994). "Active site of the replication protein of the rolling circle plasmid pC194." EMBO J. **13**: 4412-4420.

Noirot-Gros, M.-F. and S. D. Ehrlich (1996). "Change of a catalytic reaction carried out by a DNA replication protein." Science **274**(5288): 777-780.

Noirot, P., J. Bargonetti and R. P. Novick (1990). "Initiation of rolling-circle replication in pT181 plasmid: initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8560-8564.

Novick, R. P. (1987). "Plasmid incompatibility." Microbiological Reviews **51**(4): 381-395.

Novick, R. P. (1989). "Staphylococcal plasmids and their replication." Annu. Rev. Microbiol. **43**: 537-565.

Ochman, H., A. S. Gerber and D. L. Hartl (1988). "Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction." Genetics **120**(3): 621-623.

Orozco, B. M., A. B. Miller, S. B. Settlege and L. Hanley-Bowdoin (1997). "Functional domains of a geminivirus replication protein." J. Biol. Chem. **272**(15): 9840-9846.

Papavassiliou, A. G. (1993). "Localisation of DNA-protein contact points by DMS resistance of complexes resolved in gel retardation assays." Nucl. Acids Res. **21**: 757-758.

Park, J., S. Myong, A. Niedziela-Majka, K. S. Lee, J. Yu, T. M. Lohman and T. Ha (2010). "PcrA helicase dismantles RecA filaments by reeling in DNA in uniform steps." Cell **142**(4): 544-555.

Provencher, S. W. and J. Glockner (1981). "Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism." Biochemistry **20**: 33-37.

Rasooly, A. and R. P. Novick (1993). "Replication-specific inactivation of the pT181 plasmid initiator protein." Science **262**(5136): 1048-1050.

Rasooly, A., P. Wang and R. Novick (1994). "Replication-specific conversion of the *Staphylococcus aureus* pT181 initiator protein from an active homodimer to an inactive heterodimer." EMBO J. **13**(21): 5245-5251.

Ruiz-Masó, J. A., S. P. Anand, M. Espinosa, S. A. Khan and G. del Solar (2006). "Genetic and biochemical characterization of the *Streptococcus pneumoniae* PcrA helicase and its role in plasmid rolling circle replication." J. Bacteriol. **188**(21): 7416-7425.

Ruiz-Masó, J. A., L. Bordanaba-Ruiseco, M. Sanz, M. Menendez and G. Del Solar (2016). "Metal-Induced Stabilization and Activation of Plasmid Replication Initiator RepB." Front Mol Biosci **3**: 56.

Ruiz-Masó, J. A., C. López-Zumel, M. Menéndez, M. Espinosa and G. del Solar (2004). "Structural features of the initiator of replication protein RepB encoded by the promiscuous plasmid pMV158." Biochim. Biophys. Acta - Proteins & Proteomics **1696**(1): 113-119.

Ruiz-Masó, J. A., R. Lurz, M. Espinosa and G. del Solar (2007). "Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication." Nucleic Acids Res **35**(4): 1230-1244.

Ruiz-Masó, J. A., R. Lurz, M. Espinosa and G. del Solar (2007). "Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication." Nucl. Acids Res. **35**: 1230-1244.

Ruiz-Masó, J. A., C. Machón, L. Bordanaba-Ruiseco, M. Espinosa, M. Coll and G. del Solar (2015). "Plasmid rolling-circle replication." Microbiol Spectrum **3**(1): PLAS-0035-2014.

Ruiz-Masó, J. A., C. Machón, L. Bordanaba-Ruiseco, M. Espinosa, M. Coll and G. del Solar (2015). "Plasmid rolling-circle replication." Microbiol Spectrum **3**(1): **PLAS-0035-2014**.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed." Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sasnauskas, G., L. Zakrys, M. Zaremba, R. Cosstick, J. W. Gaynor, S. E. Halford and V. Siksnys (2010). "A novel mechanism for the scission of double-stranded DNA: BfiI cuts both 3'-5' and 5'-3' strands by rotating a single active site." Nucleic Acids Res **38**(7): 2399-2410.

Sasse-Dwight, S. and J. D. Gralla (1991). "Footprinting protein-DNA complexes *in Vivo*." Methods Enzymol **208**: 146-168.

Senear, D. F. and M. Brenowitz (1991). "Determination of binding constants for cooperative site-specific protein-DNA interactions using the gel mobility-shift assay." J. Biol. Chem. **266**: 13661-13671.

Shaw, P. E. and F. Stewart (1994). Identification of protein-DNA contacts with dimethyl sulfate. DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols. G. G. Kneale. Totowa, NJ, Humana Press Inc. **30**: 79-87.

Soultanas, P., M. Dillingham, F. Papadopoulos, S. Phillips, C. Thomas and D. Wigley (1999). "Plasmid replication initiator protein RepD increases the processivity of PcrA DNA helicase." Nucl. Acids Res. **27**(6): 1421-1428.

Sreerama, N. and R. W. Woody (2000). "Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set." Anal. Biochem. **287**: 252- 260.

Stassi, D. L., P. López, M. Espinosa and S. A. Lacks (1981). "Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**(11): 7028-7032.

Stillman, B. (1994). "Smart machines at the DNA replication fork." Cell **78**(5): 725-728.

Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.

Takahashi, S., Hours, C., Iwaya, M., Lane, H.E.D., and Denhardt, D.T. (1978). "The *Escherichia coli* rep gene in the single-stranded DNA phages". Denhardt, D.T., Dressler, D.H., and Ray, D.S. (eds). *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 393-400.

te Riele, H., B. Michel and S. D. Ehrlich. (1986). "Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 2541-2545.

Thanassi, J. A., S. L. Hartman-Neumann, T. J. Dougherty, B. A. Dougherty and M. J. Pucci (2002). "Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*." Nucl. Acids Res. **30**(14): 3152-3162.

Thomas, C. D., D. F. Balson and W. Shaw (1990). "In vitro studies of the initiation of staphylococcal plasmid replication. Specificity of RepD for its origin (oriD) and characterization of the Rep-ori tyrosil ester." J. Biol. Chem **265**: 5519-5530.

VanLoock, M. S., A. Alexandrov, X. Yu, N. R. Cozzarelli and E. H. Egelman (2002). "SV40 large T antigen hexamer structure: domain organization and DNA-induced conformational changes." Curr Biol **12**(6): 472-476.

Venkova, T., M. Patek and J. Nesvera (2001). "Identification of a novel gene involved in stable maintenance of plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum*." Plasmid **46**(3): 153-162.

Xia, S. and J. D. Robertus (2009). "Effect of divalent ions on the minimal relaxase domain of MobA." Arch. Biochem. Biophys. **488**(1): 42-47.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**: 103-119.

Yu, J. S. and K. M. Noll (1997). "Plasmid pRQ7 from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga* species strain RQ7 replicates by the rolling-circle mechanism." J Bacteriol **179**(22): 7161-7164.

Zhang, W., M. S. Dillingham, C. D. Thomas, S. Allen, C. J. Roberts and P. Soultanas (2007). "Directional loading and stimulation of PcrA helicase by the replication initiator protein RepD." J Mol Biol **371**(2): 336-348.

